



DESARROLLO, VALIDACIÓN E IMPLEMENTACIÓN DE UN PROCEDIMIENTO NORMALIZADO PARA EL ANÁLISIS DE ALDEHÍDOS EN VINO MEDIANTE GC-MS

Trabajo de Fin de Máster

DESCRIPCIÓN BREVE

Se presenta una metodología de análisis de aldehídos en matrices vínicas, mediante la formación de oximas con PFBHA, y su determinación mediante un sistema GC-MS

Oscar Castejón
Musulén

Universidad de
Zaragoza



Título: Desarrollo, validación e implementación de un procedimiento normalizado para el análisis de aldehídos en vino mediante GC-MS

Autor: Óscar Castejón Musulén

Trabajo de Fin de Máster

Máster Química Industrial

Departamento de Química Analítica (Facultad de Ciencias)/ Laboratorio de Análisis de Aroma y Enología

Curso Académico 2018-19

Dirección del trabajo.

Vicente Ferreira González

Ricardo J. López Gómez

*Gracias a Vicente y Ricardo por su confianza, a
mis compañeros del LAAE, Oompa Loompas
de la ciencia, con los que he pasado un año
genial. En especial a Almudena, que me
enseñó de aldehydos y de pasión por el
trabajo.*

*Y gracias a mis padres, que me han dado todo
y apoyado siempre.*

¡Venid rápido, hermanos! ¡Estoy bebiendo estrellas!

Don Pierre Perignon

Índice

	Página
1. Resumen	1
2. Introducción. Aldehídos en el vino.....	2
3. Objetivos.....	5
4. Parte experimental	6
1) Materiales, Reactivos, Equipos e Instrumentación.....	6
2) Diseño de método	8
3) Método propuesto.....	14
5. Resultados.....	15
1) Ensayos.....	15
2) Método final	19
3) Controles del método.....	20
6. Conclusiones.....	24
7. Referencias	24
 Anexos.....	 26
Anexo 1. Diagrama del tratamiento de muestra y sus operaciones.....	26
Anexo 2. Estudio de efectos matriz. Test t por parejas a las pendientes.....	27
Anexo 3. Tablas de resultados de los ensayos 1 a 6.....	28
Anexo 4. ANOVA 3 factores con replicas.....	34
Anexo 5. Gráficas y tablas del ensayo 5	38
Anexo 6. Eficiencia cromatográfica. Número de platos teóricos en el ensayo 6.....	42

1. Resumen

Dentro de la gran variedad de compuestos químicos relevantes sensorialmente en el vino, los aldehídos están relacionados con procesos de oxidación y con sus olores asociados.

Se presentan en este trabajo las etapas iniciales en el desarrollo de un método analítico para el análisis de aldehídos, tanto libres como formando aductos con el SO₂, en vino mediante el uso de O-(2,3,4,5,6-pentafluorobencil)hidroxilamina (PFBHA), formando las oximas correspondientes a cada analito, las cuales serán extraídas mediante extracción en fase sólida y cuantificadas mediante el uso de cromatografía de gases acoplada a un espectrómetro de masas.

Se estudió la linealidad y reproducibilidad del proceso, así como las primeras estrategias para monitorizar y controlar el proceso de análisis, para eventualmente implementar el método en el manual de procesos del laboratorio.

Summary

Within the great variety of sensory relevant chemical compounds in wine, aldehydes are related to oxidation processes and to their associated odours.

This paper deals with initial stages in the development of an analytical method for the analysis of free and SO₂-bonded aldehydes in wine using O-(2,3,4,5,6-pentafluorobenzyl) hydroxylamine (PFBHA), getting the corresponding oximes of each analyte, which will be extracted by solid phase extraction and further quantified by the use of gas chromatography coupled to mass spectrometry.

Linearity and reproducibility of the process was studied, as well as the first strategies for monitoring and control the analytical process, to eventually implement the method in the laboratory process manual.

2. Introducción. Aldehídos en el vino

Los procesos oxidativos están relacionados con el deterioro del aroma del vino^{1,2} o la aparición de tonos amarillos o marrones en él^{1,3}. Existe una relación entre el desarrollo del proceso oxidativo con la formación de aldehídos^{1,4} apareciendo notas de aroma a rancio, miel, pasas, fruta seca o patata cocida^{1,5,6,7}. Las moléculas detrás de estos olores son cinco aldehídos conocidos como aldehídos de Strecker, porque se forman en la denominada degradación de Strecker de los aminoácidos. En el vino y en todas las bebidas fermentadas, se pueden formar también por vía bioquímica en el seno de las células de levadura que llevan a cabo la fermentación alcohólica. Son subproductos del catabolismo de los correspondientes aminoácidos de Strecker.

Una estrategia común en la producción industrial de vino para protegerlo de la degradación oxidativa es añadir hidrogeno sulfito, como antioxidante. La acción de este antioxidante es muy compleja, ya que no reacciona de manera directa con el O_2 , sino que lo hace con algunos de los productos de la oxidación del vino, tal y como se muestra en la figura 1.

Cuando el oxígeno se disuelve en el vino (señalado en el centro de la figura 1), reacciona con el Fe (II) presente, oxidándolo a Fe(III), que a su vez oxida a un orto-difenol (en la figura como H_2Q) pasándolo a radical hidroquinona (HQ^\bullet) primero y a quinona después (Q). El O_2 acaba tomando dos electrones transferidos desde los ortodifenoles para reducirse a H_2O_2 . Es en este momento en el que interviene el SO_2 : por un lado puede reducir la quinona, regenerando el ortodifenol, y por otro lado puede reducir de forma directa el H_2O_2 a H_2O , evitando de esta manera que aquella interaccione con Fe(II) para iniciar la reacción radicalaria conocida como reacción de Fenton, generando radicales hidropéroxidos.

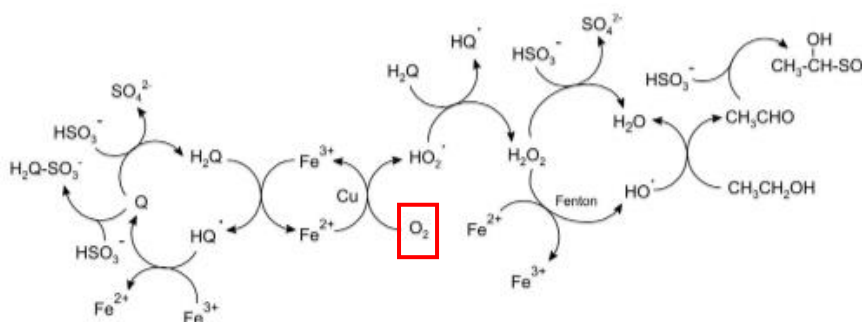


Figura 1: Esquema mecanismo de oxidación en vino tinto¹

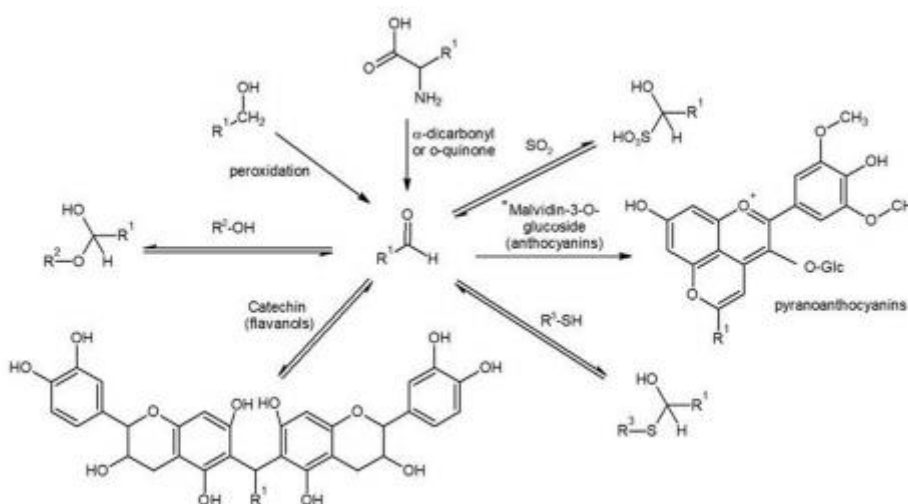


Figura 2: Esquema de reacciones/equilibrios de los aldehídos en vino¹

Sin embargo, un efecto no deseado del SO_2 , es la formación reversible de α -hidroxialquilsulfonatos, con muchos carbonilos presentes en el vino, sobre todo aldehídos, tal y como se muestra en una de las reacciones esquematizadas en la figura 2. Dadas las constantes de formación de estos hidroxialquilsulfonatos, el acetaldehído y los otros aldehídos relevantes del vino, se encuentran mayoritariamente en forma de sulfonato. Estos aductos aldehído- SO_2 no sólo hacen perder capacidad antioxidante, sino que estabilizan los aldehídos en el vino impidiendo que reaccionen irreversiblemente con los antocianos y de manera reversible (pero de reversión muy lenta) con los taninos, como se esquematiza en la figura 2. Este fenómeno de protección provoca que algunos aldehídos formados en la fermentación puedan sobrevivir a todo el proceso de elaboración y llegar prácticamente intactos hasta el embotellado, momento en el cual apenas quedan antocianos libres. Cuando esto ocurre, los hidroxialquilsulfonatos se irán rompiendo conforme el SO_2 libre del vino desaparece, provocando la acumulación de aldehídos en su forma libre.

El análisis de estos aldehídos en vino presenta varias dificultades. En primer lugar, como se ha avanzado, están mayoritariamente formando aductos con el SO_2 , pero además pueden formar complejos más débiles con otros compuestos del vino, como se ha mostrado en la figura 2, lo que genera fuertes efectos matriz. Por otro lado, los compuestos libres, son compuestos muy volátiles y que por sus características físicoquímicas interaccionan mucho con centros adsorptivos presentes en las conducciones y columnas cromatográficas. Esto provoca picos asimétricos, cambios en tiempos de retención e incluso la pérdida total del analito, lo que afecta a la repetibilidad y sobre todo robustez de los métodos de análisis.

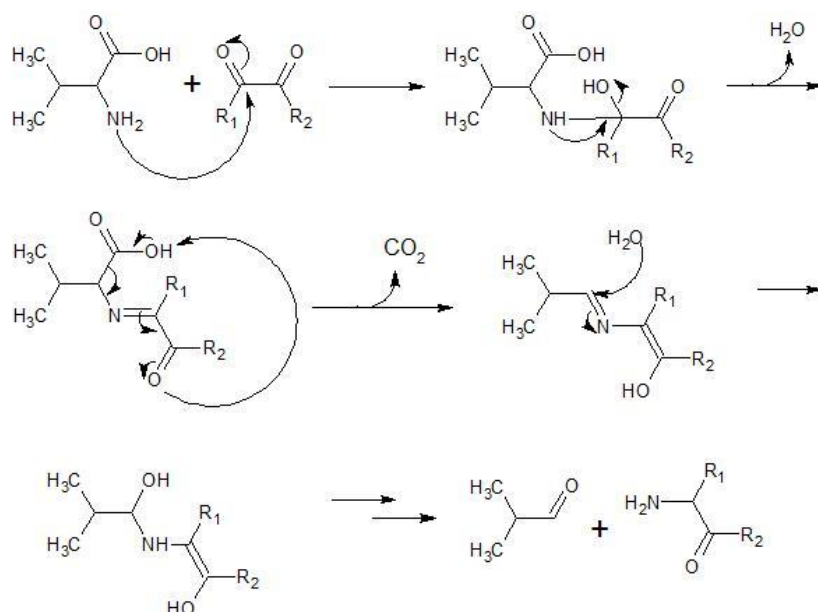


Figura 3: Formación de aldehídos a partir de aminoácidos mediante la degradación de Strecker

Tabla 1: Relación de aldehídos, olor asociado y los aminoácidos precursores.

Aminoácido Precursor	Aldehído de Strecker	Descriptor de Olor
Alanina/ Cisteína	Etanal	Rancio/ frutal
Valina	2-metilpropanal (isobutiraldehído)	Fresco/ floral/ manzana verde
Leucina	3-metilbutanal (isovaleraldehído)	Conc: grasa/ acre Dil: nuez/ cacao
Isoleucina	2-metilbutanal	Rancio/ chocolate/ café
Metionina	Metional	Patata cocida/tomate
Fenilalanina	Fenilacetaldehído	Miel/ dulce

El análisis de aldehídos libres puede realizarse sobre el espacio de cabeza, muestreando la fase gaseosa mediante Microextracción en Fase Sólida (SPME) por ejemplo e inyectándolo en un sistema de Cromatografía de Gases acoplada a Espectrometría de Masas (GC-MS)¹⁰. Sin embargo, para la determinación directa de aldehídos totales, es necesario desplazar el conjunto de equilibrios participados por los aldehídos hacia su forma libre. Una estrategia común es la derivatización de los aldehídos,

formando oximas (reacción con una R-hidroxilamina, que da derivados volátiles, analizables por GC) o hidrazonas (reacción con una R-hidrazina, que da derivados no volátiles, analizables por HPLC) que son estables en la muestra, y son compuestos menos polares, por lo que pueden ser más fácilmente aislados y cromatografiados.

La Agencia de Protección Ambiental (EPA) de Estados Unidos desarrolló una metodología de análisis de aldehídos en agua de boca basado en la derivatización de estos y posterior análisis mediante GC con un detector de captura electrónica (ECD); el método 556⁹. Este método es la base de muchos otros procedimientos de análisis de aldehídos en disoluciones acuosas, sin embargo, al ser agua destinada a consumo humano, la interrelación de los aldehídos con otras especies es considerablemente menor respecto del caso de estudio. El mecanismo de reacción del derivatizante, O-(2,3,4,5,6-pentafluorobencil)hidroxilamina (PFBHA) con los aldehídos libres se muestra en la figura 4. En la formación de las oximas se generan los dos isómeros posibles, cuestión a tener en cuenta en el análisis cromatográfico⁸.

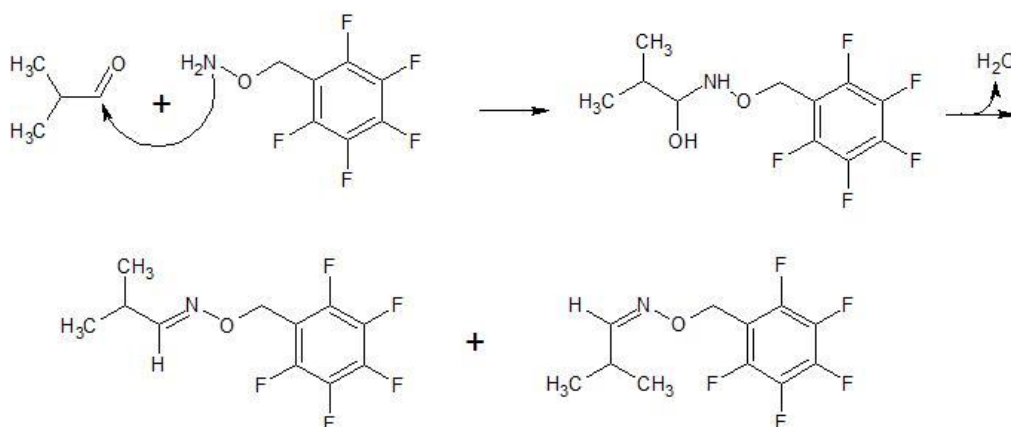


Figura 4: Mecanismo de formación de oximas con PFBHA.

En el método 556 se establecen unas condiciones de reacción optimizadas para fases acuosas, en las cuales se usa una cantidad de derivatizante muy superior a la estequiométrica, y la reacción se hace a una temperatura de 35°C durante 2 horas⁹.

3. Objetivos

Desarrollar y evaluar una metodología analítica que permita el análisis de aldehídos totales en vino, en especial de Strecker, mediante cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas. Realizar un diseño de la metodología de control de este procedimiento, así como su planificación y aplicación.

4. Parte experimental

4.1 Materiales, Reactivos, Equipos e Instrumentación

Compuestos.

- Isobutiraldehído (CAS: 78-84-2), Sigma-Aldrich $\geq 99\%$
- 2-metilbutiraldehído (CAS: 96-17-3), Sigma-Aldrich $\geq 95\%$
- 3-metilbutiraldehído (CAS: 590-86-3), Sigma-Aldrich $\geq 95\%$
- Metional (CAS:3268-49-3), Sigma-Aldrich $\geq 98\%$
- Fenilacetaldehído (CAS 122-78-1), Sigma-Aldrich $\geq 95\%$

Estándares Internos

- Metional d3 (CAS: 136430-27-8), Eptes $\geq 90\%$
- Fenilacetaldehído d5 (CAS: 879549-73-2), Eptes $\geq 95\%$
- 2-metilpentanal (CAS: 123-15-9), Sigma-Aldrich $\geq 98\%$
- 3-metilpentanal (CAS: 110-62-3), Sigma-Aldrich $\geq 97\%$

Reactivo

- PFBHA (CAS: 57981-02-9), Sigma-Aldrich $\geq 98\%$

Sistemas Cromatográficos.

Se usaron dos sistemas cromatográficos. En primer lugar, se usó un cromatógrafo Varian CP 3800 con una columna Varían VF-5MS (30m x 0,32mm x 1 μ m), con un inyector PTV 1079 (Programmable Temperature Vaporizing), un detector de trampa de iones Varian Saturn 2000 y un inyector automático CombiPal CTC-Analytics. En segundo lugar, se usó un cromatógrafo Shimadzu GC-2010, con un inyector SPL1 Split/Splitless (que trabajó en modo splitless) con una columna DB-WAX ETR (30m x

Disolventes y otros compuestos

- Etanol (CAS: 64-17-5)
- Metanol (CAS: 67-56-1)
- Hexano (CAS: 110-54-3)
- NaHCO₃ (CAS: 144-55-8)
- Ácido Tartárico (CAS: 87-69-4)
- Vino Modelo

Materiales

- Matraces (10, 20 ó 50 mL)
- Jeringas Hamilton 1000, 200, 100 μ L
- Probeta 20 mL
- Botes pirex 250/500/1000 mL
- Micropipeta
- Pipetas de 10mL
- Viales espacio de cabeza
- Bureta 10 mL
- Manifold
- Tubos SPE 1mL
- Resina Lichrolut EN (copolímero de estireno y divinilbenceno)
- Frits

0,25 mm x 0,5 μ m), como detector un cuadrupolo Shimadzu GCMS-QP 2010 y como inyector automático el Shimadzu AOC-5000.

Condiciones cromatográficas optimizadas

El flujo a través de la columna es de 1,26 mL/min, con una velocidad lineal de 40,5 cm/s y una purga de 1,0 mL/min, usando helio como gas portador. El programa de temperaturas comienza manteniendo a 40°C durante 4 minutos seguido de una rampa de 10°C/min hasta alcanzar los 250°C, que se mantienen durante 5 min.

Se inyectan 3 μ L, para lo cual se utiliza un pulso de presión de 300 kPa, con el inyector a 250°C, durante 1,50 min. El vapor en estas condiciones ocupa 0,26 mL, mientras que el inyector tiene un volumen de 0,8 mL.

Preparación de disoluciones.

Para los analitos y los estándares internos, se preparan disoluciones patrón concentradas, de forma exacta, a partir de los compuestos puros, de en torno a 3000 mg/L (salvo para el metional que es de 1500 mg/L, y los estándares internos) en etanol, en matraz y por pesada. Estas disoluciones se conservan en un congelador para garantizar su estabilidad. A partir de estas disoluciones se preparan las disoluciones de trabajo, con todos los analitos agrupados en una disolución etanólica de 25 mg/L (12 mg/L para el metional) para la disolución de dopado, y otra disolución con todos los estándares internos agrupados a una concentración de 20 mg/L en etanol.

Por otro lado, la disolución de derivatizante PFBHA se debe preparar el mismo día de su uso. Se prepara una disolución muy concentrada, de 10 g/L en agua ultrapura en un vial de volumen adecuado, por lo que se deja con agitación magnética unos 60 min.

Vinos.

Los vinos utilizados en los diferentes ensayos con sus código fueron: Vino blanco (VB)- Armantes 2016, un macabeo de bodegas San Gregorio, D.O. Calatayud; Vino rosado (VR)- Torrelongares 2015, hecho con un 50% de tempranillo y 50% de garnacha, de bodegas Covinca, D.O. Cariñena; Vino tinto 1 (VT1)- Borsao joven 2017, de bodegas Borsao, es un varietal de garnacha, tempranillo y syrah, D.O. Campo de Borja; Vino Tinto 2 (VT2)- Corona de Aragón 2016, un garnacha de Grandes Vinos, D.O. Cariñena. Vino Tinto 3 (VT3)- Azpilicueta crianza 2011, varietal de tempranillo, graciano y mazuelo de bodegas Domecq, D.O. La Rioja.

Por otro lado, se eligió el vino Don Simón como vino modelo (VM), ya que este presenta la matriz real de los vinos, sin destacar en ninguna de las características enológicas, siendo un vino muy estándar.

4.2 Diseño de método.

4.2.1 Determinaciones iniciales.

Primero se realizaron algunas comprobaciones iniciales del método 556 de la EPA aplicándolo al vino, comprobando que la reacción de los aldehídos con el PFBHA rompe los complejos sulfuroso-aldehído, al pH del vino (2,9-3,9), siendo 14 horas el tiempo de reacción necesario a 35°C. También se determina que los aldehídos (analito o estándar) añadidos a las muestras necesitan un cierto tiempo de equilibrado que se fijó inicialmente en 10 horas por resultados anteriores del laboratorio.



Figura 5:
fragmento m/z 181

Debido a que las oximas no tienen sus espectros indexados en la base de datos NIST que es usada, se aprovechó la caracterización de tiempos de retención de los aldehídos puros, para obtener también sus espectros de masas. Para todos estos ensayos se prepararon disoluciones de vino sintético (agua/etanol 13% (v/v), 5 g/L de ácido tartárico a pH 3,5) y se añadían una cantidad conocida de una disolución del aldehído puro de 3000 mg/L (o varios aldehídos). Inicialmente, para la etapa de extracción de la oxima se utilizó extracción líquido-líquido con hexano y se inyectó 1 μL en el sistema cromatográfico.

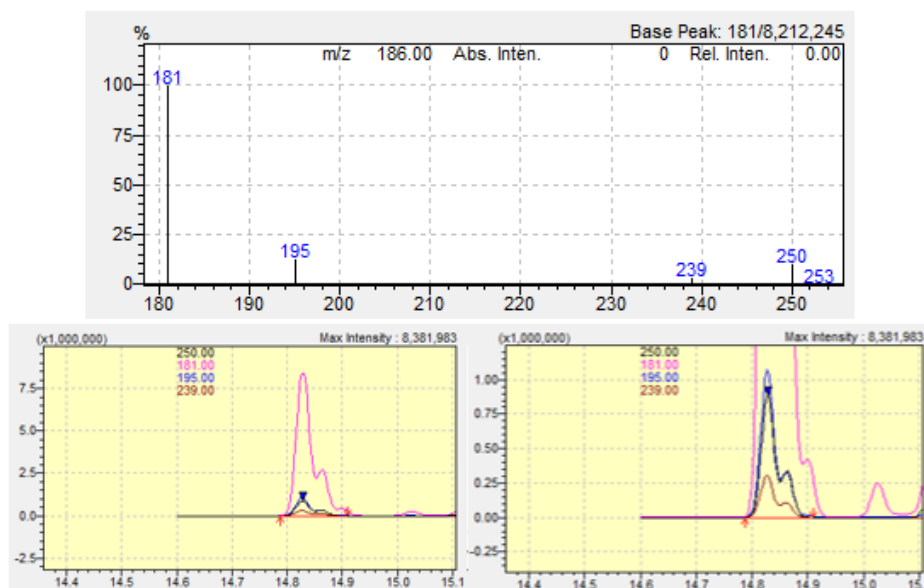


Figura 6: 1.(superior)- Espectro de masas de las dos oximas del isobutiraldehído.
2.(inferior)- Picos cromatográficos y ampliación de los mismos.

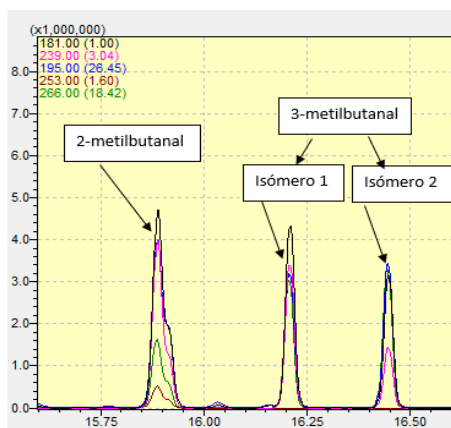


Figura 7: cromatograma de 2 y 3 metilbutanal

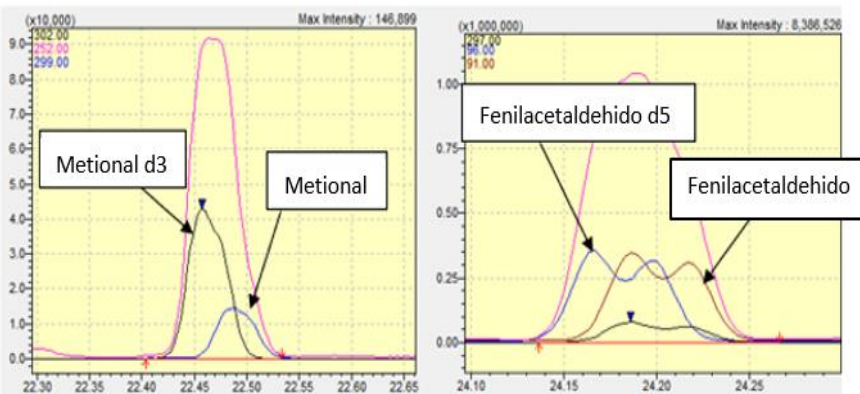


Figura 8: cromatograma de: 1.- (izq) metional, 2.- (dch) fenilacetaldéhid

La relación carga/masa 181 m/z aparece en todo el cromatograma, este fragmento es el más abundante para todas las oximas, ya que corresponde al fragmento pentafluorobencil de la figura 5. Por ejemplo, para el isobutiraldehído, el espectro de masas obtenido presenta este fragmento 181 como el más abundante, seguido de 250 y 195 m/z (figura 6.1), así como la forma del pico cromatográfico, donde se ve la superposición de los dos isómeros de la oxima mal resueltos en la figura 6.2.

En este caso, tras comprobar que no hay más señales superpuestas, se optó por tomar el área solapada como señal conjunta del analito. El otro caso posible es que los isómeros estén bien resueltos, como ocurre con el 3-metilbutanal representado en la figura 7, en cuyo caso se adquieren ambos y se integran de forma independiente, para luego sumar sus áreas.

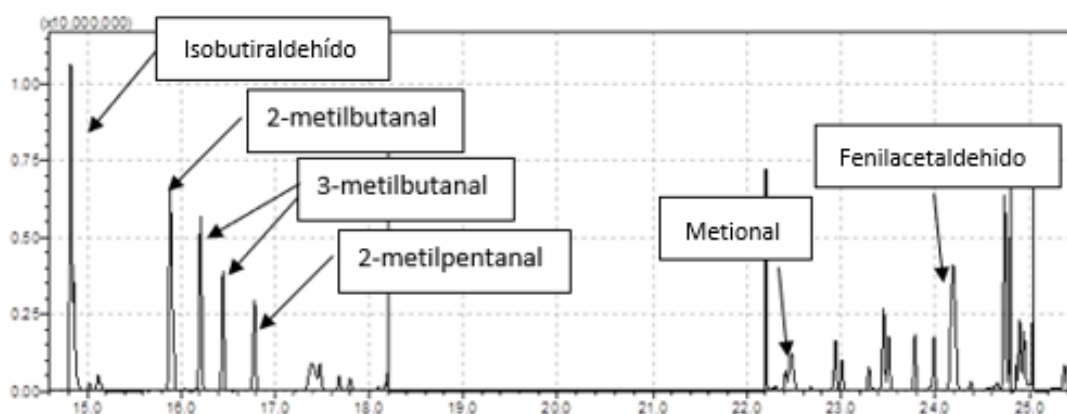


Figura 9: cromatograma completo de una muestra de vino.

Por otro lado, están las señales debidas a los estándares deuterados, que al ser básicamente el mismo compuesto, pero ligeramente más pesados, la mejor manera es

diferenciar la señal debida a cada uno por sus fragmentos de masas característicos, que en el caso del metional (figura 8.1) son 299 y 302 m/z, y para el fenilacetaldehído (figura 8.2) 297 y 301 m/z, si bien se representan 96 y 91 m/z, de forma análoga pero más intensa. Queda patente que ambas oximas se forman en todos los casos, pero no en todos son cromatográficamente separables en la fase estacionaria empleada (carbowax).

Tabla 2: relación de tiempos de retención e iones de cuantificación y confirmación para las oximas de los analitos y estándares internos.

Compuesto	t _r	Ion Cuantificación	Iones Confirmación
Isobutiraldehído	14,95	250	195, 239
2-metilbutanal	16,01	239	253, 195
3-metilbutanal 1	16,33	239	195, 266
3-metilbutanal 2	16,57	239	195, 266
2-metilpentanal	16,90	253	266, 195
Metional d3	22,58	302	252, 181
Metional	22,61	299	252, 181
Fenilacetaldehído d5	24,21	301	96, 181
Fenilacetaldehído	24,31	297	91, 181

Tabla 3: Límites de detección y cuantificación.

Compuesto	LD (μg/L)	LQ (μg/L)
Isobutiraldehído	0,004	0,014
2-metilbutanal	0,027	0,091
3-metilbutanal	0,026	0,086
2-metilpentanal	0,016	0,054
Metional d3	0,036	0,119
Metional	0,292	0,972
Fenilacetaldehído d5	0,125	0,416
Fenilacetaldehído	0,154	0,513

Identificados todos los analitos y estandares internos en el cromatograma, con los tiempos de retención y relaciones masa/carga correspondientes (figura 9 y tabla 2). Se han escogido las masas más abundantes, y por tanto más sensibles, para la cuantificación, descartando siempre la m/z 181, para mejorar la selectividad.

Por otro lado, se calculó a partir de los cromatogramas de las muestras con mayor concentración los límites de detección con las ecuaciones 1 y 2, dando los resultados reflejados en la tabla 3.

$$LD = 3 \cdot C_i \cdot \left(\frac{\text{Altura Ruido}}{\text{Altura Analito}} \right) \quad (ec. 1)$$

$$LQ = 10 \cdot C_i \cdot \left(\frac{\text{Altura Ruido}}{\text{Altura Analito}} \right) \quad (ec. 2)$$

4.2.2 Optimización SPE

Los cartuchos fueron preparados con 30 ± 1 mg de resina LiChrolut EN. En esta preparación primero se coloca un frit que soporta la resina, que tras ser añadida se tapa con otro frit y se presiona ligeramente. De forma general, la extracción en fase sólida consta de una etapa de acondicionamiento de la resina, tras lo cual se carga la muestra en la resina, seguido de un tratamiento de muestra en la resina (etapa de lavado) y después se eluye con un disolvente afín.

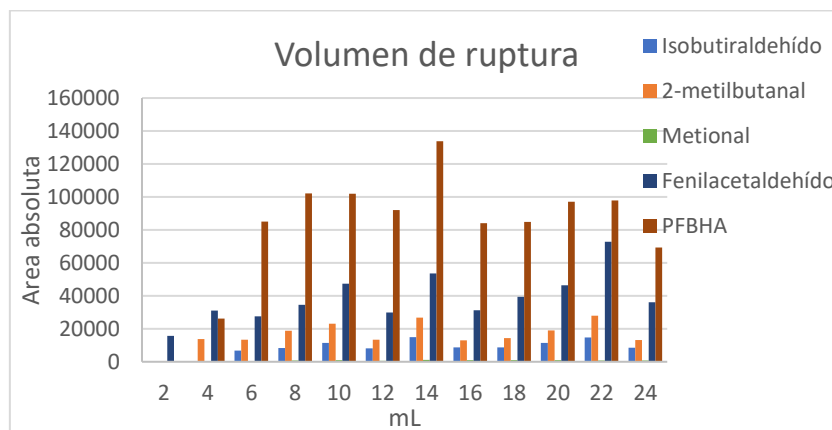


Figura 10: Área absoluta en función del volumen de muestra cargado en el cartucho de SPE

Para determinar el volumen de muestra a cargar se hizo un ensayo de volumen de ruptura, es decir, el volumen que podemos pasar por la resina reteniendo cuantitativamente los compuestos de interés. Para determinar este volumen, se determinó la cantidad de cada uno de los analitos presentes en la disolución tras su paso por el lecho, y se representó frente al volumen aplicado con el fin de obtener la curva de ruptura. Ésta suele tomar valores muy pequeños al comienzo e ir aumentando con el volumen hasta un punto de saturación donde el exceso de analito no llega a retenerse, por lo que el valor tenderá a asintotar con volúmenes crecientes.

Como se muestra en la figura 10, a partir de los 8 mL hasta los 22 mL la señal se mantiene en torno a un cierto valor medio, viendo un resultado fuera de la tendencia a 14 mL, que probablemente es un valor anómalo. Se elige 10 mL de carga de muestra, ya que es el volumen de ruptura o está muy próximo.

La SPE es una cromatografía de desarrollo frontal, siendo la resina la fase estacionaria, por lo que hay cierto grado de movilidad de los compuestos en el seno de la fase sólida dependiendo de la disolución que este circulando a través de ella. Por tanto, otro parámetro importante es el tipo de disolución de lavado y el volumen necesario para

maximizar la capacidad de eluir los analitos minimizando la presencia del resto de compuestos posibles y la pérdida de analito por arrastre.

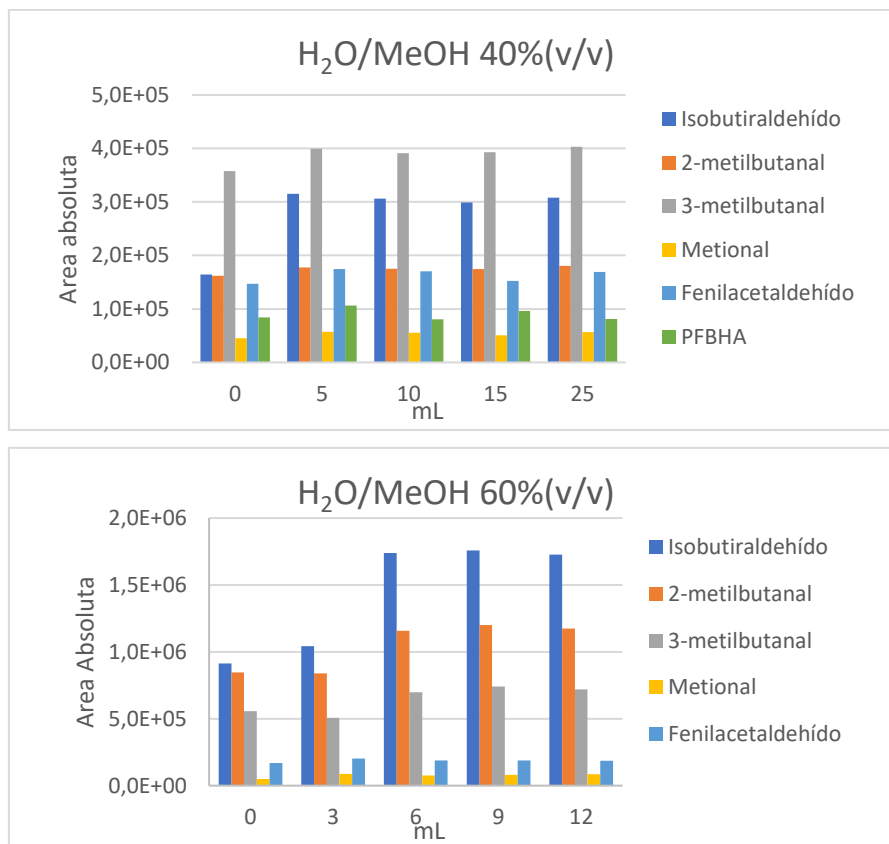


Figura 11: Área absoluta en función del volumen de lavado cargado en el cartucho de SPE

Tabla 4: Incremento del área entre el lavado de 10 mL 40% metanol y 9 mL 60% metanol respecto de no lavar.

Incremento de Área		
	MeOH 40%	MeOH 60%
Isobutiraldehído	1,82	1,93
2-metilbutanal	1,08	1,42
3-metilbutanal	1,10	1,33
Metional	1,12	1,64
Fenilacetaldéhid	1,04	1,12

De forma similar al estudio del volumen de ruptura se ensayaron dos tipos de disoluciones de lavado analizando las eluciones obtenidas. La primera fue una disolución de agua con un 40% (v/v) de metanol y un 1% de NaHCO₃, utilizando volúmenes de 0, 5, 10, 15 y 25 mL, mientras que la segunda

fue igual, pero con un 60% de metanol, ensayando los volúmenes 0, 3, 6, 9 y 12 mL.

En la figura 11 se muestran los resultados obtenidos para ambos lavados aplicados a dos vinos diferentes, observándose que en ningún caso el lavado parece introducir pérdida en los analitos, lo que nos permite obtener extractos mucho más limpios. De hecho, lo que se observa es un aumento de la señal, sobre todo para el isobutiraldehído (tabla 4) con los lavados. Este incremento se debe a una eliminación de interferentes, que

es más intensa con el 60% de metanol. Esto se refleja en una mejora del cromatograma, especialmente para el metional, el cual genera la menor respuesta de todos los analitos.

4.2.3 Estudio de efectos matriz.

Para el estudio de efectos matriz en el intervalo de concentraciones de trabajo de los diferentes aldehídos en diferentes tipos de vino, se realizaron adiciones estándar de diferentes vinos y una calibración directa en una matriz de vino sintética.

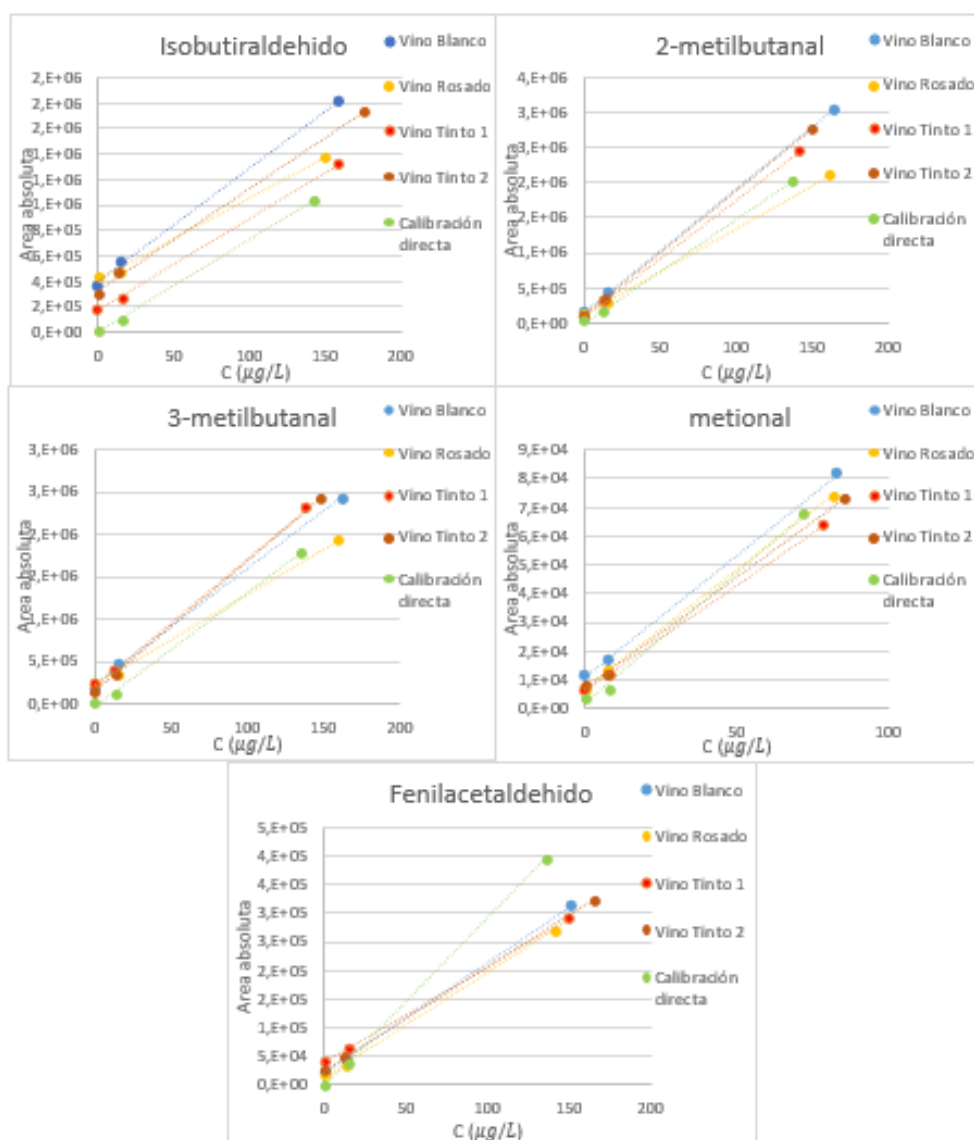


Figura 12: Rectas obtenidas en diferentes vinos en áreas absolutas.

El procedimiento que se siguió para todas las matrices fue: preparar 3 puntos en matraces de 50 mL a concentraciones crecientes (0, 20, 150 $\mu\text{g/L}$), añadiendo la cantidad de disolución de dopado correspondiente. Se añadió la disolución de estándar interno de forma que la concentración resultante de todos estuviera en torno a 50 $\mu\text{g/L}$. Estas

disoluciones se trasvasaron a viales, se dejaron equilibrando durante 10 h, después se adicionó a cada vial el reactivo derivatizante y reaccionó a 35°C durante 14 h.

Tras el acondicionamiento de los cartuchos de SPE se vierten 10 mL con pipeta en cada cartucho y 10 mL de disolución de lavado. Se eluye con 1,2 mL de hexano desde una bureta que se recogen en un vial con septum para llevar al instrumento.

En la figura 12 se representan la media de las tres réplicas (que solo se diferencian en el proceso de extracción e inyección), y junto con la desviación estándar calculamos la RSD de cada punto, teniendo una RSD promedio de 5,23% de todos los puntos, si bien en el caso del vino blanco algunos de los puntos superaron RSD del 20%, en concreto en el punto de calibración de 150 $\mu\text{g/L}$ el fenilacetaldehído tiene una RSD del 23,1%. Por otro lado, el coeficiente de determinación de todas las rectas (R^2) fue superior a 0,9971 (coeficiente de la recta de isobutiraldehído en vino rosado), teniendo un coeficiente promedio de 0,9995.

Al aplicar un test t (anexo 2) a las pendientes obtenidas respecto de los diferentes vinos comparadas con la obtenida con la matriz de vino sintética se comprueba que hay efectos matriz en todos los casos, por lo que en este punto se descarta poder aplicar calibración directa en el método.

4.3 Método propuesto

En cuanto al método que se propone para la calibración, atendiendo a la respuesta lineal vista en el apartado anterior, así como el efecto matriz, se propone intentar minimizar los efectos matriz mediante el uso de estándares internos lo más parecidos posible a los analitos y realizar una calibración por factor de respuesta sobre un vino modelo bien caracterizado y estable.

Se proponen como estándares internos 2-metilpentanal, [$^2\text{H}_3$]-metional y [$^2\text{H}_5$]-fenilacetaldehído, de forma que sometidos al mismo proceso que los aldehídos permitan corregir la varianza debida al tratamiento de la muestra y el proceso de inyección.

El procedimiento, reflejado en el diagrama adjuntado en el anexo 1, es tomar una alícuota de la muestra, trasvasarla a un vial de volumen adecuado y añadir el estándar interno. El vial se deja 10 horas “equilibrando” a temperatura ambiente, dando un tiempo suficiente a que el estándar interno establezca los equilibrios equivalentes a los de los analitos. Tras este tiempo se añade el derivatizante y se deja 14 horas reaccionando a

35°C, tras lo cual se realiza la extracción en fase sólida (SPE), llevando el extracto obtenido al sistema cromatográfico presentado previamente.

Para el factor de respuesta, el vino modelo sigue el mismo proceso, con el añadido de que, para el punto dopado, junto con los estándares internos se añade una cantidad conocida de disolución de dopado.

5. Resultados

5.1 Ensayos del método propuesto

Durante 5 meses se realizaron los análisis para diferentes lotes de muestras, constituidas por los vinos presentados en el apartado 4.1, así como el vino modelo. Se analizaron 90 muestras en total, agrupadas en 6 ensayos diferentes, se adjuntan en anexo 3 las tablas de resultados de cada ensayo.

Los dos primeros ensayos consisten en una validación previa del método preliminar presentado en el apartado 4.3 donde se ensayaron 4 vinos (vino blanco, vino rosado, vino tinto 1 y vino tinto 2) para comprobar el factor de respuesta obtenido en las diferentes matrices. Al calcular el valor medio del factor de respuesta (FR) para los distintos vinos se aprecia una elevada variabilidad entre vinos, con RSDs entre el 8,7 y el 17%, sugiriendo que aún con los estándares internos empleados, se sigue notando el efecto matriz dada esta irreproducibilidad (tabla 5). Este resultado no era esperado, dado que se están empleando estándares deuterados que deberían comportarse de manera idéntica a los analitos. Por ello consideramos tres opciones no excluyentes:

1. Que el problema podría venir originado porque el tiempo de equilibrado de los estándares internos en la matriz era insuficiente.
2. Que el pH, tiempo de reacción o cantidad de reactivo no fueran los más adecuados y provocaran rendimientos muy dependientes de la matriz.
3. Que las disoluciones de trabajo no fueran estables pese a ser guardadas en el congelador.

Para investigar este último efecto, se compararon las áreas obtenidas en dos experimentos de dopado, uno sobre vino referencia (vino modelo) y otro sobre otro vino (tinto 2), empleando una disolución recién preparada por dilución de la madre y una segunda que ya llevaba 3 meses. Los datos de la tabla 6 muestran que en todos los casos la disminución es significativa en el caso de los vinos modelo, y en todos menos en el

isobutiraldehído y 3-metilbutanal, en el vino tinto. Los peores resultados se obtienen para el metional.

Tabla 5: promedio de las medias obtenidas para cada vino del ensayo 1

AR (0 µg/L)	media	s	RSD(%)
Isobutiraldehído	0,54	0,14	26
2-metilbutanal	0,25	0,12	50
3-metilbutanal	1,21	0,40	33
Metional	0,07	0,03	38
Fenilacetaldehído	0,16	0,10	62

AR (200 µg/L)	media	s	RSD(%)
Isobutiraldehído	2,44	0,29	12
2-metilbutanal	3,88	0,42	11
3-metilbutanal	11,41	1,07	9
Metional	0,49	0,07	14
Fenilacetaldehído	1,59	0,07	4

FR (L/µg)	media	s	RSD(%)
Isobutiraldehído	11,64	1,96	17
2-metilbutanal	23,58	2,46	10
3-metilbutanal	67,39	5,87	9
Metional	5,08	0,56	11
Fenilacetaldehído	9,24	1,01	11

En cuanto a la posibilidad de que el tiempo de equilibrado no fuera suficiente, en el ensayo 3 se fijó el pH en 3, y se trabajó con dos tiempos de equilibrado, 12 y 24 horas, trabajando con los 4 vinos de los ensayos 1 y 2, junto con el vino modelo. En este ensayo de nuevo encontramos diferencias importantes entre la respuesta obtenida entre las diferentes matrices. No obstante, se percibe una disminución del área relativa entre las 12 y 24 h, reflejado en el anexo 3, lo que sugiere que, en efecto, el tiempo de equilibrado tiene un efecto, por lo que podemos pensar que no se ha alcanzado el equilibrio.

Tabla 6: comparación entre dos disoluciones de dopado a partir de disoluciones concentradas preparadas en distinto tiempo

	vino modelo				p
	madre 3 meses		madre 1 día		
	A.rel media	s	A.rel media	s	
Isobutiraldehído	1,423	0,020	1,764	0,007	0,0006
2-metilbutanal	2,335	0,021	2,915	0,143	0,0101
3-metilbutanal	8,243	0,139	8,709	0,988	0,2519
Metional	0,448	0,006	2,245	0,008	>0,0001
Fenilacetaldehído	1,170	0,008	1,647	0,032	0,0008
	vino tinto 2				p
Isobutiraldehído	1,595	0,030	1,691	0,125	0,1631
2-metilbutanal	2,331	0,054	2,880	0,060	0,0035
3-metilbutanal	7,287	0,248	8,934	0,490	0,0175
Metional	0,556	0,012	2,188	0,092	0,0005
Fenilacetaldehído	1,249	0,025	1,562	0,110	0,0202

En el ensayo 4 se investiga la segunda posibilidad enumerada anteriormente. Para ello, se realizó un diseño factorial, utilizando dos niveles de pH (3 y 3,5), dos tiempos de reacción (14 y 24 horas) y dos cantidades de derivatizante (der1: método inicial apartado

4.3; der2: el doble de der1). Al haber una cantidad considerable de muestras por cada matriz, se eligió estudiar dos matrices que habían proporcionado resultados más diferentes entre sí, vino tinto 2 y el vino modelo. Se realizó un ANOVA de tres factores con réplicas (desarrollado en el anexo 4) que concluye que, aunque la cantidad de derivatizante aumenta significativamente en la señal obtenida, ni homogeneiza los factores de respuesta de los vinos estudiados, ni mejora los rendimientos, por lo que se concluye que los efectos matriz deben ser mayoritariamente debidos a un tiempo de equilibrado insuficiente.

Debe pensarse que, si aldehídos y estándares tienen diferentes constantes cinéticas de interacción con el SO₂ y otros compuestos de la matriz, las áreas relativas entre analito y estándar serían covariantes con la matriz y el tiempo.

En el ensayo 5, se estudian los mismos vinos que en el ensayo 4 (vino tinto 2 y vino modelo) a temperatura ambiente y tiempos de equilibrado crecientes.

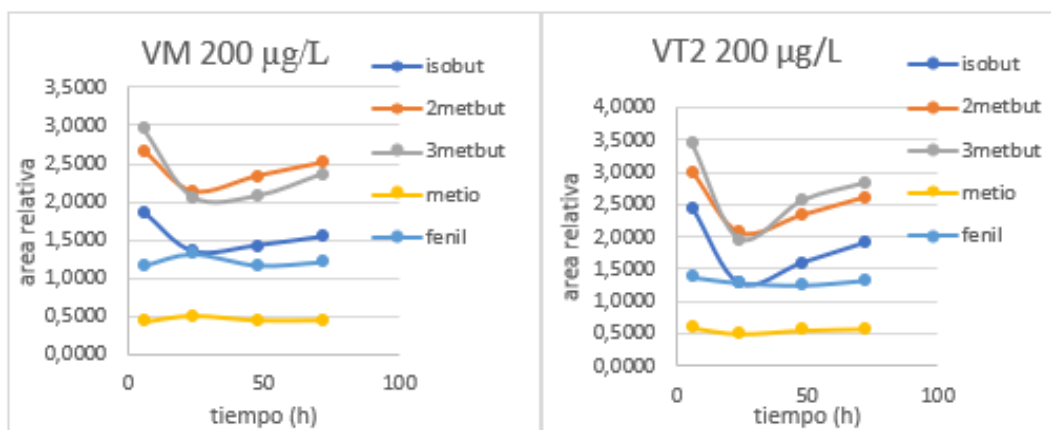


Figura 13: Evolución del área relativa en función del tiempo a temperatura ambiente para vino modelo y vino tinto 2

Los resultados mostrados en la figura 13 confirman que las áreas relativas varían fuertemente con el tiempo y que lo hacen de una manera matricialmente dependiente, como se había hipotetizado. Puede verse que los mayores cambios se dan entre los 3 primeros tiempos y que, por encima de 50 h, el cambio es menor y que sigue un patrón ya similar entre vinos. Si estudiamos la variabilidad intramuestra del factor de respuesta, esto es la repetibilidad del análisis en función del tiempo, puede verse en la figura 14 cómo ésta depende fuertemente con él, siendo muy mala para tiempos iguales o menores a 24 horas, sobre todo en el caso del vino tinto 2. Puede verse que se estabiliza a partir de las 48 horas. Finalmente, a este tiempo los factores de respuesta en ambos vinos son

prácticamente iguales, lo que se comprueba con un test t de dos colas (tabla 7). A 72 h la conclusión es la misma, pero los resultados son todavía mejores, lo que confirma que el problema era el tiempo de equilibrado y que dejando tiempos no inferiores a 48 h, se consigue una mejora significativa de la repetibilidad y una casi total disminución del efecto matriz.

Tabla 7: comparación entre factores de respuesta obtenidos en dos vinos diferentes

Factor de respuesta ($\mu\text{g/L}$)	VM (72 h)			VT2 (72 h)			p
	Rep 1	Rep 2	Rep 3	Rep 1	Rep 2	Rep 3	
Isobutiraldehído	7,609	6,832	7,352	7,670	8,172	7,863	
2-metilbutanal	15,352	14,099	15,252	15,194	15,420	15,345	
3-metilbutanal	36,210	33,496	38,170	35,157	37,038	35,455	
Metional	4,971	4,769	5,170	5,401	5,309	5,196	
Fenilacetaldehído	5,208	4,985	5,590	5,812	5,392	5,569	
	media	s	RSD	media	s	RSD	
Isobutiraldehído	7,26	0,40	5,4	7,90	0,25	3,2	0,1435
2-metilbutanal	14,90	0,70	4,7	15,32	0,11	0,8	0,4122
3-metilbutanal	35,96	2,35	6,5	35,88	1,01	2,8	0,9639
Metional	4,97	0,20	4,0	5,30	0,10	1,9	0,1251
Fenilacetaldehído	5,26	0,31	5,8	5,59	0,21	3,8	0,2640

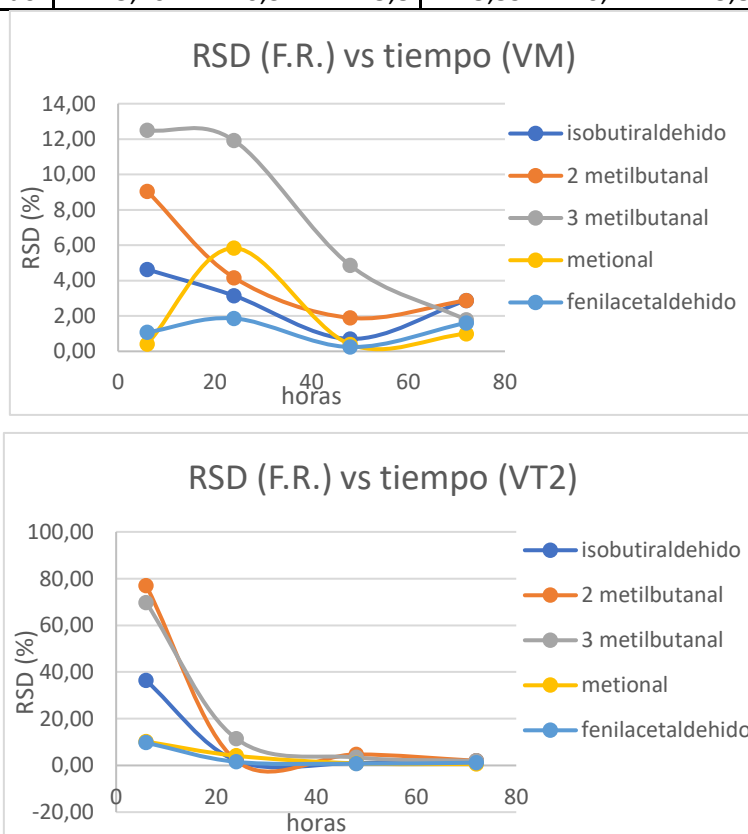


Figura 14: evolución de la variabilidad de los factores de respuesta con el tiempo de equilibrado para vino modelo y vino tinto 2

Asumiendo que a las 72 horas se ha alcanzado el equilibrio, se realizó un ensayo a temperatura superior para ver si es posible rebajar el tiempo de equilibrio. Este ensayo

se hizo con un solo vino (vino tinto 3) que se puso a equilibrar a 50°C en tiempos crecientes, comparándose los resultados con el obtenido dejándolo 72 horas a temperatura ambiente (figura 15).

Puede verse que desde el primer momento se obtienen factores de respuesta muy parecidos, pareciéndose obtener la máxima similaridad tras 6 h de equilibrado a 50°C. Por encima de este tiempo los factores de respuesta pierden estabilidad. Los datos de la tabla 8 muestran que no hay diferencia alguna entre los resultados obtenidos a 72 h a temperatura ambiente y los de 6 h a 50°C. Las diferencias con los factores de respuesta obtenidos para el vino modelo tampoco llegan a diferenciarse significativamente, salvo para el metional, para el que se usó una disolución nueva.

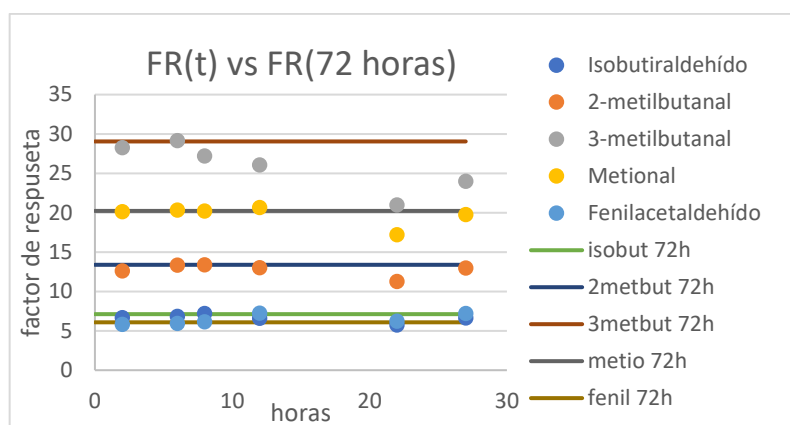


Figura 15: comparación de los factores de respuesta a 50°C frente a 72 horas

Tabla 8: comparación entre los resultados del ensayo 5 y 6

	V. Modelo 72h				V. Tinto 3 72h				V. Tinto 6h (50°C)			
	media	s	RSD		media	s	RSD		media	s	RSD	
Isobutiraldehído	7,26	0,40	5,4		7,12	0,30	4,2		6,82	0,57	8,3	
2-metilbutanal	14,90	0,70	4,7		13,39	0,44	3,3		13,31	0,18	1,4	
3-metilbutanal	35,96	2,35	6,5		29,05	0,88	3,0		29,12	1,45	5,0	
Metional	4,97	0,20	4,0		20,23	0,41	2,0		20,30	0,84	4,2	
Fenilacetaldéhído	5,26	0,31	5,8		6,08	0,24	3,9		5,94	0,10	1,7	
	VM/VT3 72h				VM/VT3 6h				VT3 72h/VT3 6h			
	t exp	p			t exp	p			t exp	p		
Isobutiraldehído	0,52	0,6547			1,11	0,3842			0,79	0,5118		
2-metilbutanal	3,18	0,0862			3,83	0,0618			0,29	0,8023		
3-metilbutanal	4,78	0,0411			4,29	0,0502			0,08	0,9461		
Metional	57,59	0,0003			30,67	0,0011			0,14	0,9046		
Fenilacetaldéhído	3,66	0,0671			3,64	0,0679			0,97	0,4350		

5.2 Método definitivo

Las disoluciones de estándares, analitos, derivatizante, lavado o vino sintético son preparadas como se marca en el apartado 4.1 con la salvedad de que se añade el estándar

interno 3-metilpentanal, debido a que su isómero no compensa suficientemente los efectos matriz vistos para el analito 3-metilbutanal.

Preparación de la muestra: En anoxia, se toman 12 mL de la muestra en una probeta. De ellos, unos 2 mL se transfieren con ayuda de un cuentagotas a un vial de 20 mL. Sobre este volumen se añaden los 30 μ L de la disolución de IS con microjeringa, y se vierte la muestra restante arrastrando con la muestra las paredes del vial. Se pone un tapón con septum y se agita manualmente.

Se lleva a una estufa a 50°C durante 6 horas y se deja atemperar, tras lo cual se añaden 360 μ L de disolución de derivatizante perforando el septum y agitando manualmente después. Se deja reaccionar durante 14 horas a 35°C y se deja atemperar.

La SPE se realiza como ya se ha explicado anteriormente, primero acondicionar la resina (1 mL diclorometano \rightarrow 1 mL metanol \rightarrow 1 mL vino sintético). Con pipeta se toman 10 mL del vial, que se percolan por succión a vacío, y después 10 mL de la disolución de lavado que igualmente se percolan. Se seca a vacío y utilizando una bureta se eluye con 1'2 mL de hexano. El vial final se lleva al equipo cromatográfico.

Preparación de las muestras control: En anoxia, se toman 12 mL de vino modelo en la probeta, de los cuales se añaden a un vial 2 mL con cuenta gotas, después se añaden 30 μ L de la disolución de IS y 100 μ L de disolución de dopado con microjeringa, y se vierte el vino restante arrastrando las paredes del vial. Se pone un tapón con septum y se agita manualmente. El resto del proceso es igual al de preparación de la muestra.

Para el cálculo de factor de respuesta: En anoxia, se prepara una alícuota de vino modelo sin dopar (procedimiento de la preparación de muestra) y otra dopada (procedimiento de la muestra control).

5.3 Controles del método

5.3.1 Sistema cromatográfico

Antes de cada lote hay que realizar la inyección de una muestra de referencia interna, ya que para mejorar los límites de detección y cuantificación se trabaja con el cuadrupolo el modo de adquisición SIM (Selected Ion Monitoring), lo que requiere establecer unos intervalos de tiempo donde se monitorizan un grupo de iones predeterminados para ser adquiridos. Con esta muestra de referencia interna se comprueba cualitativamente que el sistema cromatográfico se está comportando correctamente y que los tiempos de retención de éste están dentro de las ventanas SIM.

La figura 9 es el cromatograma de la referencia interna usada el 4 mayo de 2019, correspondiente a la comprobación del ensayo 4. Esta comprobación se realiza posteriormente a otros ensayos de puesta en marcha como el uso de una disolución Grob o el autotuning del propio equipo, y se reflejan en la figura 16 para esquematizar esta toma de decisiones.

La disolución de referencia interna esta constituida por los extractos ya analizados de muestras control y factores de respuesta hechos sobre vino modelo.

Para poder realizar una evaluación más cuantitativa se propone el estudio en el tiempo del número de platos teórico para cada señal, evaluando la anchura de pico y los tiempos de retención de las muestras control de los lotes. Con esta estrategia se pretende monitorizar la eficiencia en la separación para controlar la potencial degradación de las condiciones cromatográficas, debido a restos de reactivo o a sustancias co-extraídas con los analitos.

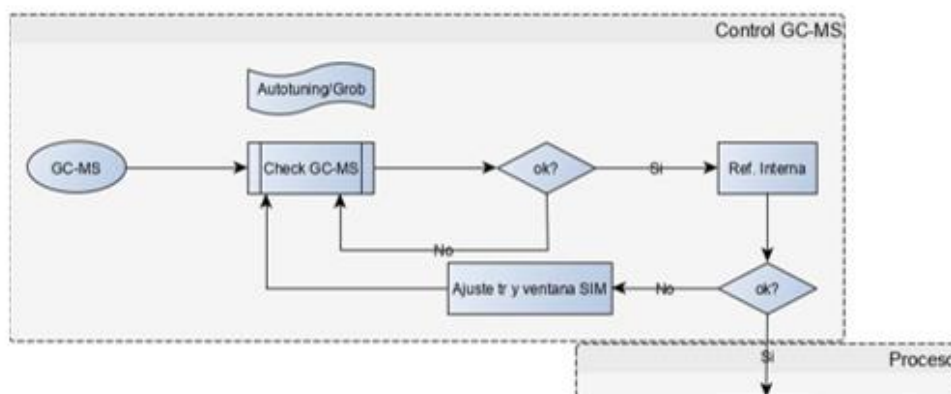


Figura 16: Diagrama de decisión sobre el estado del sistema GC-MS.

5.2.2 Control de muestra. Proceso e inyección.

Se propone utilizar los propios estándares internos para validar un tratamiento de muestra y su inyección, es decir, evaluar el proceso de manera global, ya que no se añade un estándar de inyección.

Tomando los valores de los 26 cromatogramas, que como se ve en la figura 17 se agrupan entorno a ciertos valores, se estima la repetibilidad del proceso, y los primeros parámetros “históricos” de control, mostrados en la tabla 8, estableciendo se dos regiones, $\bar{x} \pm 2 * s$ y $\bar{x} \pm 3 * s$. Si un parámetro está comprendido en el intervalo más/menos dos veces la desviación histórica de este, el valor se acepta, en caso de estar entre dos y tres veces la desviación estándar se señalará como advertencia, con el fin de buscar tendencias en este parámetro y perturbaciones en el procedimiento.

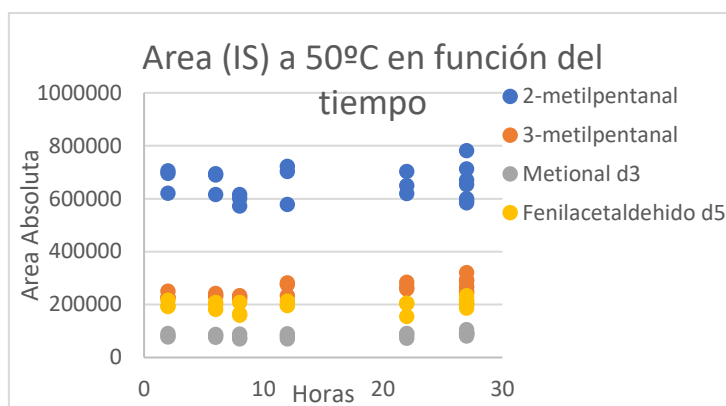


Figura 17: Área de los IS en el ensayo 6.

Por último, parámetros fuera del intervalo 3s suponen el rechazo de la muestra. Se analizan en todas las muestras el área absoluta de los estándares y la relación entre estos, como refleja la ecuación 3.

$$relación\ IS = \frac{Area\ IS_i}{Area\ IS_j} \quad Ec. 3$$

Tabla 9: Área media de los IS en el ensayo 6, su relación e intervalos.

Área absoluta		Media	S	RSD (%)	
	2-metilpentanal	645.929	64.522	10,0	
	3-metilpentanal	250.027	30.146	12,1	
	Metional d3	83.367	9.702	11,6	
	Fenilacetaldehído d5	196.543	19.290	9,8	
Relación entre IS		Media	s	RSD (%)	
IS(j)	IS(i)				
2-metilpentanal	3-metilpentanal	0,388	0,031	8,1	
2-metilpentanal	Metional d3	0,129	0,012	9,4	
2-metilpentanal	Fenilacetaldehído d5	0,306	0,030	9,8	
Metional d3	Fenilacetaldehído d5	2,368	0,170	7,2	
Metional d3	3-metilpentanal	3,008	0,246	8,2	
Fenilacetaldehído d5	3-metilpentanal	1,277	0,140	11,0	
		intervalo 2*s		intervalo 3*s	
Área absoluta		Inferior	Superior	Inferior	Superior
	2-metilpentanal	516.886	774.972	452.365	839.494
	3-metilpentanal	189.735	310.319	159.589	340.465
	Metional d3	63.964	102.771	54.262	112.472
	Fenilacetaldehído d5	157.964	235.122	138.674	254.411
Relación entre IS		intervalo 2*s		intervalo 3*s	
IS(j)	IS(i)	Inferior	Superior	Inferior	Superior
2-metilpentanal	3-metilpentanal	0,326	0,450	0,294	0,481
2-metilpentanal	Metional d3	0,105	0,154	0,093	0,166
2-metilpentanal	Fenilacetaldehído d5	0,246	0,365	0,216	0,395
Metional d3	Fenilacetaldehído d5	2,027	2,708	1,857	2,877
Metional d3	3-metilpentanal	2,515	3,501	2,269	3,747
Fenilacetaldehído d5	3-metilpentanal	0,996	1,558	0,855	1,698

La repetitividad del proceso completo, estimada a partir de las áreas absolutas de los estándares en las 26 muestras, está en torno a un 10%, no pudiendo hablar de reproducibilidad al momento de presentar este trabajo. Por otro lado, en la figura 17 se esquematizan algunas situaciones comunes y la decisión a tomar.

Por ejemplo, en el caso de que el área de uno de los estándares este por debajo del intervalo $3s$, pero las proporciones entre estándares estén dentro de sus respectivos intervalos, denota un posible problema en la inyección o del reactivo. Siendo más probable el primer caso, debido a que se trabaja en splitless con volúmenes grandes y pulso de presión, es posible que se haya inyectado una menor cantidad, por lo que ante esta situación lo primero sería reinyectar la muestra, y ver si el efecto perdura. En caso afirmativo, no podemos diferenciar entre un problema en el inyector y el caso del reactivo en mal estado, ya que en ambos casos este efecto estará presente en todas las muestras del lote.

Otra opción es que la relación de áreas entre los estándares no se cumpla, en este caso, independientemente de sus áreas absolutas, la muestra queda invalidada. Esto puede ser debido a algún fallo en el procedimiento, por lo que la muestra debe repetirse y no puede reinjectarse.

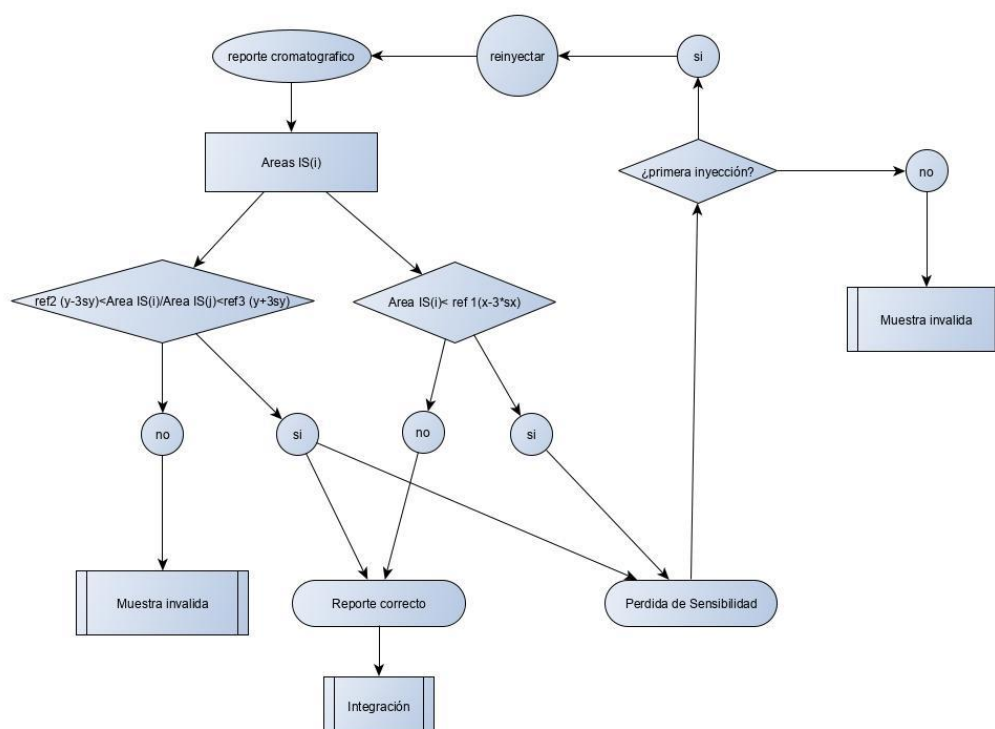


Figura 18: Diagrama de decisión sobre la validez de un cromatograma.

5.2.3. Control de lote y calibración (factor de respuesta).

Para hacer el método más robusto en el tiempo se propone la siguiente estrategia de control, utilizando una de las muestras del lote y vino modelo. La primera muestra, elegida aleatoriamente al principio del proceso, se analiza sin dopar y se analiza dopada por triplicado, permitiendo calcular un factor de respuesta sobre ella. Por otro lado, se analiza el vino modelo sin dopar, como una muestra normal, aleatorizada dentro de la cola de inyección, y tres muestras independientes de vino modelo, de las cuales una se situará al final de la cola de muestra.

Los valores de áreas absolutas del vino modelo se utilizarán para evaluar la eficiencia del sistema cromatográfico, mientras que los valores de factor de respuesta permitirán evaluar tendencias en el tiempo, y problemas en los reactivos.

Por último, el lote se acepta si los factores de respuesta de ambas matrices son aceptados como iguales al ser sometidas a un test t.

6. Conclusiones

Se ha desarrollado y evaluado un procedimiento de análisis, llegando a una metodología que satisface las necesidades presentadas por el problema a estudio. Si bien no se ha llegado a una validación completa y a un control prolongado en el tiempo, debido a las limitaciones temporales del Trabajo de Fin de Master, se ha obtenido un método final que permite el análisis de aldehídos en vino.

Los resultados muestran un método de análisis de aldehídos en vino, con una buena repetibilidad, reproducibilidad y unos límites de detección y cuantificación adecuados. La utilización de la reacción de derivatización muestra ser una estrategia robusta que simplifica el análisis total de aldehídos mejorando su estabilidad, sus características cromatográficas y su detectabilidad. Queda pendiente una parte de la validación realizando un ensayo de recuperación con un grupo más amplio de muestras diferentes, para poder considerar el método completamente validado.

Como conclusión, se han satisfecho los objetivos académicos y personales, y casi por completo los objetivos propuestos al comienzo de este trabajo.

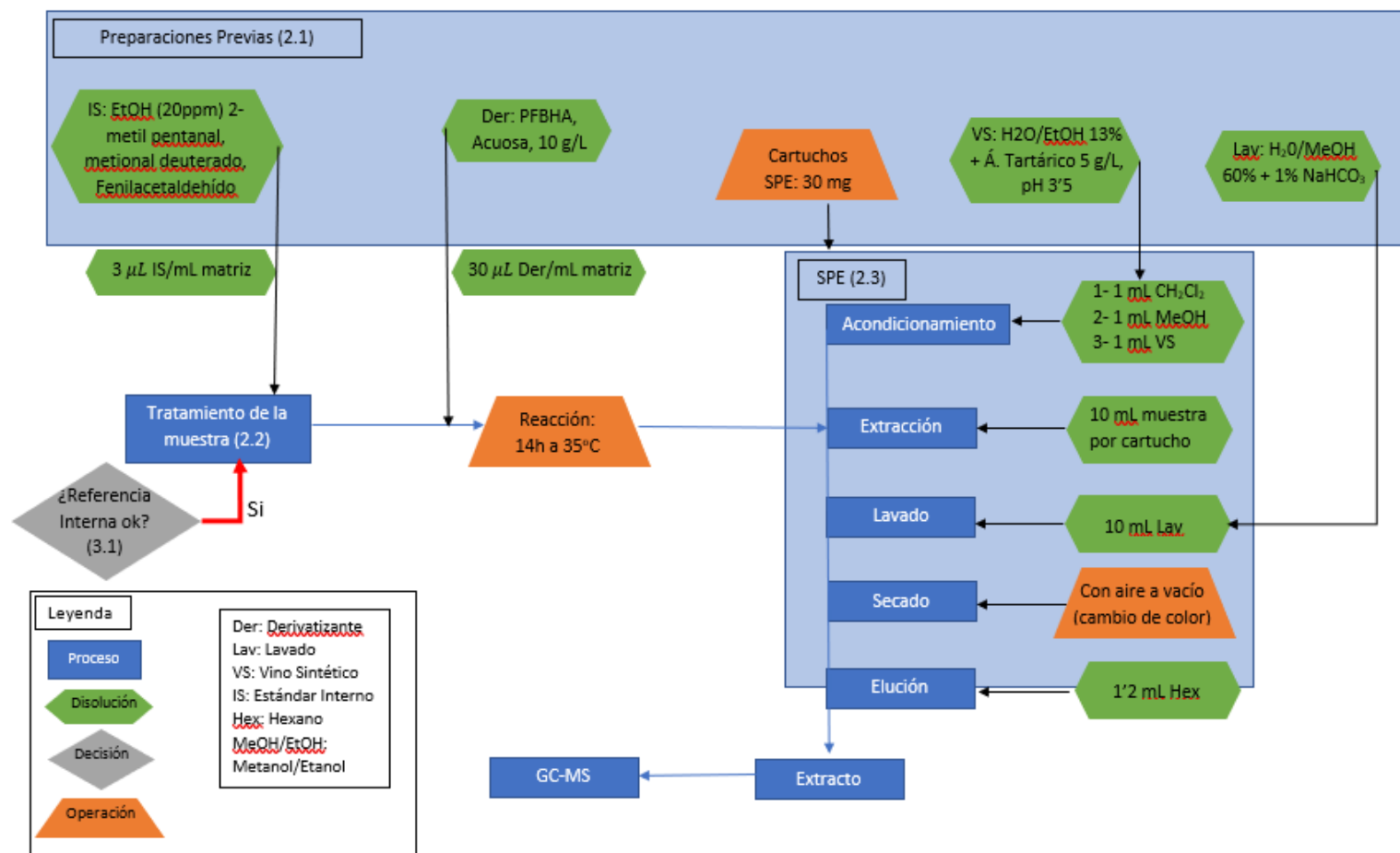
7. Referencias

1. Bueno, M., Marrufo-Curtido, A., Carrascon, V., Fernandez-Zurbano, P., Escudero, A., Ferreira, V., (2018) *Formation and Accumulation of Acetaldehyde*

- and Strecker Aldehydes during Red Wine Oxidation*. *Frontiers in Chemistry*, 6, 20.
2. Ferreira, V., Bueno, M., Franco-Luesma, E., Cullere, L., and Fernandez-Zurbano, P. (2014). *Key changes in wine aroma active compounds during bottle storage of spanish red wines under different oxygen levels*. *J. Agric. Food Chem.* 62, 10015-10027
 3. Singleton, V. L., and Kramling, T. E. (1976). *Browning of white wines and an accelerated test for browning capacity*. *Am. J. Enol. Vitic.* 27, 157-160
 4. Cullere, L., Cacho, J., and Ferreira, V., (2007). *An assessment of the role played by some oxidation-related aldehydes in wine aroma*. *J. Agric. Food Chem.* 55, 876-881
 5. Escudero, A., Cacho, J., and Ferreira, V. (2000). *Isolation and identification of odorants generated in wine during its oxidation: a gas chromatography-olfactometric study*. *Eur. Food Res Technol.* 211, 105-110
 6. Escudero, A., Hernandez-Orte, P., Cacho, J., and Ferreira, V. (2000). *Clues about the role of methional as character impact odorant of some oxidized wines*. *J. Agric. Food Chem.* 48, 4268-4272.
 7. Ferreira, A. C. S., Hogg, T., and de Pinho, P. G. (2003). *Identification of key odorants related to the typical aroma of oxidation-spoiled white wines*. *J. Agric. Food Chem.* 51, 1377-1381.
 8. Ferreira, V., Culleré, L., López, R., Cacho, J., (2004). *Determination of important odor-active aldehydes of wine through gas chromatography-mass spectrometry of their O-(2,3,4,5,6-pentafluorobenzyl)oximes formed directly in the solid phase extraction cartridge used for selective isolation*. *J. Chromatography A*. 1028, 339-345
 9. Munch, J.W., Munch, D.J., Winslow, S.D., Wendelken, S.C., Pepich B.V., (1998). *Epa Method 556: Determination of carbonyl compounds in drinking water, by pentafluorobenzylhydroxylamine derivatization and capillary gas chromatography with electron capture detection*. *Methods for the determination of organic and inorganic compounds in drinking water, volumen 1*, US Environmental Protection Agency, Cincinnati, Ohio.
 10. Bueno, M., Zapata, J., Ferreira, V., (2014) *Simultaneous determination of free and bonded forms of odor-active carbonyls in wine using a headspace solid phase microextraction strategy* *J. Chromatography A* 1369 33-42

Anexos.

Anexo 1. Diagrama del tratamiento de muestra y sus operaciones.



Anexo 2. Estudio de efectos matriz. Test t por parejas a las pendientes.

parámetro t teórico	2,92
---------------------	------

Isobutiraldehído	blanco	rosado	tinto1	tinto2	sintético
blanco	-	5,65	5,62	2,22	4,84
rosado		-	2,49	3,63	2,33
tinto1			-	2,58	0,16
tinto2				-	2,18
sintetico					-
2-metilbutanal	blanco	rosado	tinto1	tinto2	sintético
blanco	-	26,49	12,40	2,44	6,68
rosado		-	21,30	26,93	4,85
tinto1			-	13,29	4,55
tinto2				-	7,04
sintetico					-
3-metilbutanal	blanco	rosado	tinto1	tinto2	sintético
blanco	-	5,46	2,82	3,36	0,74
rosado		-	16,77	18,14	5,55
tinto1			-	4,58	4,79
tinto2				-	5,51
sintetico					-
Metional	blanco	rosado	tinto1	tinto2	sintético
blanco	-	1,88	27,60	3,09	0,98
rosado		-	4,34	2,35	1,52
tinto1			-	1,34	2,81
tinto2				-	2,21
sintetico					-
Fenilacetaldehído	blanco	rosado	tinto1	tinto2	sintético
blanco	-	3,38	24,18	9,16	22,72
rosado		-	3,72	0,12	20,33
tinto1			-	19,73	29,72
tinto2				-	26,31
sintetico					-

Anexo 3. Tabla de resultados de los ensayos 1 a 6.

	V. Blanco	V. Blanco	V. Tinto 1	V. Tinto 1	V. Tinto 2	V. Tinto 2	V. Rosado	V. Rosado
[C] (µg/L)	0	200	0	200	0	200	0	200
t equilibrado (h)	10	10	10	10	10	10	10	10
t reacción (h)	14	14	14	14	14	14	14	14
	No	No	No	No	No	No	No	No
pH	controlado	controlado	controlado	controlado	controlado	controlado	controlado	controlado
PFBHA	der1	der1	der1	der1	der1	der1	der1	der1
ensayo	1	1	1	1	1	1	1	1
T _{equilibrado} (°C)	23	23	23	23	23	23	23	23

Área relativa

Isobutiraldehído	0,5950	2,3101	0,4673	2,4896	0,7321	2,3579	0,6048	2,5330
2-metilbutanal	0,2490	3,8450	0,5378	4,6107	0,2764	3,7689	0,1775	3,8772
3-metilbutanal	0,9773	10,7807	2,1483	13,1358	1,0916	10,7409	1,1157	12,2861
Metional	0,0631	0,4150	0,1197	0,4508	0,0624	0,4418	0,0328	0,4190
Fenilacetaldehído	0,1086	1,6708	0,3721	1,6139	0,1339	1,6299	0,0818	1,6420

Factor de respuesta (L/µg)

Isobutiraldehído	10,74	14,06	9,31	12,92
2-metilbutanal	22,65	27,41	21,61	22,89
3-metilbutanal	62,56	75,21	60,50	70,04
Metional	4,25	4,94	4,45	4,72
Fenilacetaldehído	10,35	9,32	9,06	11,05

	V. Blanco 1	V. Blanco 1	V. Tinto 1	V. Tinto 1	V. Tinto 2	V. Tinto 2	V. Rosado	V. Rosado
[C] (µg/L)	0	200	0	200	0	200	0	200
t equilibrado (h)	10	10	10	10	10	10	10	10
t reacción(h)	14	14	14	14	14	14	14	14
	No	No	No	No	No	No	No	No
pH	controlado	controlado	controlado	controlado	controlado	controlado	controlado	controlado
PFBHA	der1	der1	der1	der1	der1	der1	der1	der1
ensayo	2	2	2	2	2	2	2	2
T _{equilibrado} (°C)	23	23	23	23	23	23	23	23

Área relativa

Isobutiraldehído	0,4868	2,3019	0,2708	2,3524	0,6413	3,0726	0,5014	2,0939
2-metilbutanal	0,2034	3,5140	0,1563	3,8578	0,2580	4,2803	0,1554	3,2514
3-metilbutanal	0,8323	10,1341	1,1839	11,8527	1,2341	12,0380	1,0994	10,3038
Metional	0,0766	0,5552	0,0963	0,5720	0,0853	0,5725	0,0474	0,5236
Fenilacetaldehído	0,0906	1,5934	0,2154	1,5385	0,1678	1,5408	0,0901	1,4701

Factor de respuesta (L/µg)

Isobutiraldehído	10,56	12,11	14,15	9,27
2-metilbutanal	22,05	24,65	26,79	20,62
3-metilbutanal	63,00	72,26	73,17	62,34
Metional	5,56	5,52	5,66	5,53
Fenilacetaldehído	9,19	8,09	8,40	8,44

	V.D. Simon	V.D. Simon	V.D. Simon	V.D. Simon	V.D. Simon	V.D. Simon	V.Rosado	V.Rosado
[C] (µg/L)	0	200	0	200	0	200	0	200
t equilibrado (h)	12	12	12	12	12	12	12	12
t reacción (h)	14	14	14	14	14	14	14	14
	No	No	No	No	No	No	No	No
pH	controlado	controlado	controlado	controlado	controlado	controlado	controlado	controlado
PFBHA	der1	der1	der1	der1	der1	der1	der1	der1
ensayo	3	3	3	3	3	3	3	3
T_equilibrado(°C)	23	23	23	23	23	23	23	23

Área relativa

Isobutiraldehído	0,1768	2,0787	0,1507	1,8902	0,1302	1,8660	0,4784	2,2051
2-metilbutanal	0,1470	4,0515	0,1434	3,8745	0,1214	3,9338	0,1389	3,6372
3-metilbutanal	2,7249	11,4439	2,6390	10,4753	2,2985	10,5263	0,9790	8,7766
Metional	0,1555	0,6814	0,1627	0,6232	0,1481	0,6271	0,0679	0,5711
Fenilacetalddehído	0,4203	2,2503	0,4075	1,9419	0,3748	1,9877	0,1130	1,9596

Factor de respuesta (L/µg)

Isobutiraldehído	8,20	7,50	7,48	7,44
2-metilbutanal	16,44	15,71	16,05	14,73
3-metilbutanal	38,44	34,55	36,28	34,38
Metional	4,09	3,58	3,73	3,92
Fenilacetalddehído	7,47	6,27	6,59	7,54

	V.Blanco 1	V.Blanco 1	V.Rosado	V.Rosado	V. Tinto 1	V. Tinto 1	V. Tinto 2	V. Tinto 2
[C] (µg/L)	0	200	0	200	0	200	0	200
t equilibrado (h)	12	12	12	12	12	12	12	12
t reacción (h)	14	14	14	14	14	14	14	14
	No	No	No	No	No	No	No	No
pH	controlado	controlado	controlado	controlado	controlado	controlado	controlado	controlado
PFBHA	der1	der1	der1	der1	der1	der1	der1	der1
Ensayo	3	3	3	3	3	3	3	3
T_equilibrado(°C)	23	23	23	23	23	23	23	23

Área relativa

Isobutiraldehído	0,4027	2,3277	0,3334	1,9056	0,2508	2,0838	0,3500	2,2212
2-metilbutanal	0,1695	4,3035	0,1093	3,4140	0,1595	4,0322	0,1603	3,9712
3-metilbutanal	0,8683	9,7133	0,7353	8,6442	0,9640	9,3945	0,7501	9,6164
Metional	0,1337	0,6859	0,0668	0,5613	0,1455	0,6208	0,1201	0,6288
Fenilacetalddehído	0,1696	2,4197	0,1016	1,8978	0,3120	1,9575	0,2271	2,0336

Factor de respuesta (L/µg)

Isobutiraldehído	8,30	6,78	7,90	8,06
2-metilbutanal	17,41	13,92	16,31	16,05
3-metilbutanal	39,00	34,87	37,17	39,09
Metional	4,30	3,85	3,70	3,96
Fenilacetalddehído	9,19	7,34	6,72	7,38

	V.D. Simon	V.D. Simon	V.D. Simon	V.D. Simon	V.Blanco 1	V.Blanco 1	V.Rosado	V.Rosado
[C] (µg/L)	0	200	0	200	0	200	0	200
t equilibrado (h)	24	24	24	24	24	24	24	24
t reacción (h)	14	14	14	14	14	14	14	14
	No	No	No	No	No	No	No	No
pH	controlado	controlado	controlado	controlado	controlado	controlado	controlado	controlado
PFBHA	der1	der1	der1	der1	der1	der1	der1	der1
Ensayo	3	3	3	3	3	3	3	3
T_equilibrado(°C)	23	23	23	23	23	23	23	23

Área relativa

Isobutiraldehído	0,1608	1,8305	0,1480	1,8307	0,3414	1,6196	0,3400	1,8551
2-metilbutanal	0,1418	3,5383	0,1306	3,6090	0,1447	3,1149	0,1144	3,2574
3-metilbutanal	2,9628	9,7892	2,7218	10,1405	0,8713	7,2399	0,8915	8,3258
Metional	0,1813	0,6062	0,1667	0,5987	0,1592	0,7737	0,0831	0,5765
Fenilacetaldehído	0,4361	1,9228	0,4216	1,8849	0,1548	2,2767	0,1288	1,8477

Factor de respuesta (L/µg)

Isobutiraldehído	7,20	7,25	5,51	6,53
2-metilbutanal	14,30	14,65	12,51	13,24
3-metilbutanal	30,10	32,71	28,08	32,78
Metional	3,31	3,36	4,78	3,84
Fenilacetaldehído	6,07	5,98	8,67	7,02

	V. Tinto 1	V. Tinto 1	V. Tinto 2	V. Tinto 2
[C] (µg/L)	0	200	0	200
t equilibrado (t)	24	24	24	24
t reacción (t)	14	14	14	14
	No	No	No	No
pH	controlado	controlado	controlado	controlado
PFBHA	der1	der1	der1	der1
ensayo	3	3	3	3
T_equilibrado(°C)	23	23	23	23

Área relativa

Isobutiraldehído	0,2487	1,9979	0,3258	1,8378
2-metilbutanal	0,1554	3,5625	0,1492	3,2637
3-metilbutanal	0,8944	8,2218	0,6475	7,5402
Metional	0,1416	0,6064	0,1078	0,5896
Fenilacetaldehído	0,2911	1,9386	0,2106	1,8912

Factor de respuesta (L/µg)

Isobutiraldehído	7,54	6,52
2-metilbutanal	14,35	13,12
3-metilbutanal	32,31	30,39
Metional	3,62	3,75
Fenilacetaldehído	6,73	6,87

	V.D.Simon	V.D.Simon	V.D.Simon	V.D.Simon	V.D.Simon	V.D.Simon	V.D.Simon	V.D.Simon
[C] (µg/L)	200	200	200	200	200	200	200	200
t equilibrado (h)	24	24	24	24	24	24	24	24
t reacción (h)	14	14	14	14	24	24	24	24
pH	3	3,5	3	3,5	3	3,5	3	3,5
PFBHA	der1	der1	der2	der2	der1	der1	der2	der2
Ensayo	4	4	4	4	4	4	4	4
T_equilibrado(°C)	23	23	23	23	23	23	23	23

Área relativa

Isobutiraldehído	1,6936	1,7809	1,9166	1,9484	1,6417	1,7243	1,9859	1,9223
2-metilbutanal	3,4181	3,4681	3,7455	3,7708	3,4317	3,5394	3,8403	3,7671
3-metilbutanal	7,6022	9,2167	8,1967	10,3595	7,8447	9,3450	10,2137	10,4319
Metional	0,7137	0,6600	0,7479	0,6898	0,7494	0,6788	0,7521	0,7235
Fenilacetaldehído	1,9800	1,8841	2,0644	2,0248	2,0154	1,8665	2,0103	1,9857

Factor de respuesta (L/µg)

Isobutiraldehído	3,99	4,25	4,65	4,75	3,83	4,08	4,86	4,67
2-metilbutanal	9,16	9,30	10,08	10,15	9,20	9,50	10,35	10,14
3-metilbutanal	18,93	23,81	20,73	27,27	19,66	24,20	26,83	27,49
Metional	3,13	2,86	3,31	3,01	3,32	2,95	3,33	3,18
Fenilacetaldehído	5,32	5,03	5,58	5,46	5,43	4,98	5,41	5,34

	V. Tinto 2	V. Tinto 2	V. Tinto 2	V. Tinto 2	V. Tinto 2	V. Tinto 2	V. Tinto 2	V. Tinto 2
[C] (µg/L)	200	200	200	200	200	200	200	200
t equilibrado (h)	24	24	24	24	24	24	24	24
t reacción (h)	14	14	14	14	24	24	24	24
pH	3,5	3	3,5	3	3,5	3	3,5	3
PFBHA	der1	der1	der2	der2	der1	der1	der2	der2
ensayo	4	4	4	4	4	4	4	4
T_equilibrado(°C)	23	23	23	23	23	23	23	23

Área relativa

Isobutiraldehído	2,4011	2,2606	2,2174	2,3691	2,1816	2,3685	2,5669	2,3726
2-metilbutanal	3,9419	3,7187	3,6905	3,8508	3,8137	3,8347	4,0946	3,9952
3-metilbutanal	8,5302	7,1717	7,8556	7,4492	8,2396	7,1039	8,5672	7,7728
Metional	0,6532	0,7034	0,6502	0,7200	0,6954	0,8042	0,7093	0,7779
Fenilacetaldehído	1,9421	1,9504	2,0076	2,0579	1,9210	2,0695	2,0306	2,0292

Factor de respuesta (L/µg)

Isobutiraldehído	5,93	5,52	5,39	5,83	5,44	6,00	6,60	6,02
2-metilbutanal	11,21	10,55	10,47	10,94	10,27	10,33	11,07	10,79
3-metilbutanal	21,20	17,19	19,21	18,01	20,86	17,42	21,85	19,45
Metional	2,93	3,20	2,92	3,29	3,04	3,60	3,11	3,46
Fenilacetaldehído	5,16	5,19	5,36	5,51	5,14	5,59	5,47	5,47

	V.D.Simon	V.D.Simon	V. Tinto 2	V. Tinto 2	V.D.Simon	V.D.Simon	V. Tinto 2	V. Tinto 2
[C] (µg/L)	200	200	200	200	200	200	200	200
t equilibrado (h)	6	6	6	6	24	24	24	24
t reacción (h)	14	14	14	14	14	14	14	14
	No	No	No	No	No	No	No	No
pH	controlado	controlado	controlado	controlado	controlado	controlado	controlado	controlado
PFBHA	der1	der1	der1	der1	der1	der1	der1	der1
ensayo	5	5	5	5	5	5	5	5
T_equilibrado(°C)	23	23	23	23	23	23	23	23

Área relativa

Isobutiraldehído	0,1710	1,8584	0,3055	2,3002	6,2378	1,3516	0,3214	1,2825
2-metilbutanal	0,1535	2,6552	0,1386	2,8619	6,6823	2,1371	0,1560	2,0559
3-metilbutanal	1,9927	9,4301	0,7993	9,1229	99,8841	7,3172	0,8376	7,0212
Metional	0,0921	0,4285	0,1754	0,5775	3,9846	0,5123	0,2203	0,5144
Fenilacetalddehído	0,2282	1,1667	0,2587	1,3504	10,6280	1,3295	0,3055	1,3044

Factor de respuesta (L/µg)

Isobutiraldehído	8,80	10,40	6,16	5,01
2-metilbutanal	15,86	17,27	12,58	12,05
3-metilbutanal	39,09	43,75	27,99	32,50
Metional	4,73	5,66	5,91	4,14
Fenilacetalddehído	5,22	6,08	6,13	5,56

	V.D.Simon	V.D.Simon	V. Tinto 2	V. Tinto 2	V.D.Simon	V.D.Simon	V. Tinto 2	V. Tinto 2
[C] (µg/L)	200	200	200	200	200	200	200	200
t equilibrado (h)	48	48	48	48	72	72	72	72
t reacción (h)	14	14	14	14	14	14	14	14
	No	No	No	No	No	No	No	No
pH	controlado	controlado	controlado	controlado	controlado	controlado	controlado	controlado
PFBHA	der1	der1	der1	der1	der1	der1	der1	der1
ensayo	5	5	5	5	5	5	5	5
T_equilibrado(°C)	23	23	23	23	23	23	23	23

Área relativa

Isobutiraldehído	0,1329	1,4221	0,3038	1,5946	0,1449	1,5334	0,3868	1,9035
2-metilbutanal	0,1379	2,3345	0,1507	2,3296	0,1568	2,5001	0,1928	2,6096
3-metilbutanal	1,8634	8,2407	0,8208	7,2775	1,9193	8,7207	1,0412	7,8720
Metional	0,0918	0,4482	0,1840	0,5556	0,0988	0,4513	0,2022	0,5791
Fenilacetalddehído	0,2349	1,1702	0,2648	1,2478	0,2689	1,2115	0,3247	1,3273

Factor de respuesta (L/µg)

Isobutiraldehído	6,72	6,73	7,24	7,91
2-metilbutanal	13,93	13,81	14,86	15,32
3-metilbutanal	33,52	33,94	35,75	35,90
Metional	5,02	5,23	4,96	5,30
Fenilacetalddehído	5,21	5,47	5,25	5,58

	V.Tinto 3	V.Tinto 3	V.Tinto 3	V.Tinto 3	V.Tinto 3	V.Tinto 3	V.Tinto 3	V.Tinto 3	V.Tinto 3
[C] (µg/L)	200	200	200	200	200	0	200	0	200
t equilibrado (h)	2	6	8	12	22	27	27	72	72
t reacción (h)	14	14	14	14	14	14	14	14	14
	No	No	No	No	No	No	No	No	No
pH	controlado	controlado	controlado	controlado	controlado	controlado	controlado	controlado	controlado
PFBHA	der1	der1	der1	der1	der1	der1	der1	der1	der1
Ensayo	6	6	6	6	3	6	6	6	6
T_equilibrado(°C)	50	50	50	50	50	50	50	amb	amb
Área relativa									
Isobutiraldehído	1,7117	1,7437	1,8251	1,6835	1,5122	0,2932	1,6982	0,3447	1,8557
2-metilbutanal	2,5596	2,6967	2,7056	2,6313	2,3028	0,1662	2,6231	0,2233	2,7646
3-metilbutanal	7,6244	7,8592	7,3735	7,0722	5,8054	0,4933	6,5335	0,7830	8,1214
Metional	2,3518	2,3692	2,3566	2,4057	1,9879	0,0937	2,3028	0,1351	2,4038
Fenilacetaldehído	1,5144	1,5425	1,5884	1,8488	1,5821	0,1509	1,8296	0,1784	1,6006
Factor de respuesta (L/µg)									
Isobutiraldehído	6,66	6,81	7,20	6,53	5,73		6,60		7,10
2-metilbutanal	12,59	13,31	13,36	12,97	11,24		12,92		13,37
3-metilbutanal	28,18	29,11	27,19	26,00	21,00		23,87		29,00
Metional	20,11	20,26	20,15	20,59	16,87		19,67		20,20
Fenilacetaldehído	5,81	5,93	6,13	7,24	6,10		7,16		6,06

Anexo 4. ANOVA 3 factores con replicas.

Se ha seguido el método de cálculo explicado en los apuntes de bioestadística de la universidad de Granada (<http://wpd.ugr.es/~bioestad/wp-content/uploads/Factorial-tres-factores.pdf>; consultada el 20 de mayo de 2019).

$$y_{ijk} = \mu + \tau_i + \beta_j + \gamma_k + (\tau\beta)_{ij} + (\tau\gamma)_{ik} + (\beta\gamma)_{jk} + (\tau\beta\gamma)_{ijk} + u_{ijk}$$

La suma de cuadrados sería:

- $SCT = \sum_{i,j,k,l} y_{ijkl}^2 - (y_{....})^2 / (abcr)$; $SCA = (\sum_i y_{i...}^2) / (bcr) - (y_{....})^2 / (abcr)$
- $SCB = (\sum_j y_{.j..}^2) / (acr) - (y_{....})^2 / (abcr)$; $SCC = (\sum_k y_{...k}^2) / (abr) - (y_{....})^2 / (abcr)$
- $SC(AB) = (\sum_{i,j} y_{ij..}^2) / (cr) - (y_{....})^2 / (abcr) - SCA - SCB$
- $SC(BC) = (\sum_{j,k} y_{.jk.}^2) / (ar) - (y_{....})^2 / (abcr) - SCB - SCC$
- $SC(AC) = (\sum_{i,k} y_{i.k.}^2) / (br) - (y_{....})^2 / (abcr) - SCA - SCC$
- $SC(ABC) = (\sum_{i,j,k} y_{ijk.}^2) / r - (y_{....})^2 / (abcr) - SCA - SCB - SCC - SC(AB) - SC(AC) - SC(BC)$
- $SCR = SCT - SCA - SCB - SCC - SC(AB) - SC(AC) - SC(BC) - SC(ABC)$.

Los contrastes de hipótesis a realizar se expresan como:

- i) $H_{0A} \equiv \tau_1 = \dots = \tau_a = 0 : F_A = \frac{CMA}{CMR} \rightsquigarrow_{H_{0A}} F_{(a-1), abc(r-1)}$
- ii) $H_{0B} \equiv \beta_1 = \dots = \beta_b = 0 : F_B = \frac{CMB}{CMR} \rightsquigarrow_{H_{0B}} F_{(b-1), abc(r-1)}$
- iii) $H_{0C} \equiv \gamma_1 = \dots = \gamma_c = 0 : F_C = \frac{CMC}{CMR} \rightsquigarrow_{H_{0C}} F_{(c-1), abc(r-1)}$
- iv) $H_{0(AB)} \equiv (\tau\beta)_{ij} = 0, \forall i, j : F_{(AB)} = \frac{CM(AB)}{CMR} \rightsquigarrow_{H_{0(AB)}} F_{(a-1)(b-1), abc(r-1)}$
- v) $H_{0(AC)} \equiv (\tau\gamma)_{ik} = 0, \forall i, k : F_{(AC)} = \frac{CM(AC)}{CMR} \rightsquigarrow_{H_{0(AC)}} F_{(a-1)(c-1), abc(r-1)}$
- vi) $H_{0(BC)} \equiv (\beta\gamma)_{jk} = 0, \forall j, k : F_{(BC)} = \frac{CM(BC)}{CMR} \rightsquigarrow_{H_{0(BC)}} F_{(b-1)(c-1), abc(r-1)}$
- vii) $H_{0(ABC)} \equiv (\alpha\beta\gamma)_{ijk} = 0, \forall i, j, k : F_{(ABC)} = \frac{CM(ABC)}{CMR} \rightsquigarrow_{H_{0(ABC)}} F_{(a-1)(b-1)(c-1), abc(r-1)}$

En la tabla siguiente se resume el método.

F. V.	S. C.	G. L.	C. M.	F_{exp}
Factor A	SCA	$a - 1$	CMA	CMA/CMR
Factor B	SCB	$b - 1$	CMB	CMB/CMR
Factor C	SCC	$c - 1$	CMC	CMC/CMR
AxB	SC(AB)	$(a - 1)(b - 1)$	CM(AB)	$CM(AB)/CMR$
AxC	SC(AC)	$(a - 1)(c - 1)$	CM(AC)	$CM(AC)/CMR$
BxC	SC(BC)	$(b - 1)(c - 1)$	CM(BC)	$CM(BC)/CMR$
AxBxC	SC(ABC)	$(a - 1)(b - 1)(c - 1)$	CM(ABC)	$CM(ABC)/CMR$
Residual	SCR	$abc(r - 1)$	CMR	
TOTAL	SCT	$abcr - 1$	CMT	

Aplicando lo a las áreas relativas obtenidas en el ensayo 4.

isobutiraldehído replicas

tiempo A
ph B
der C

	14		24	
	3,5	3	3,5	3
der1	1,7952	1,6930	1,8037	1,6729
	1,8109	1,6864	1,5897	1,6408
	1,7371	1,7017	1,7734	1,6114
der2	1,9732	1,8592	2,0534	1,7801
	2,0184	1,9652	1,8576	2,2303
	1,8591	1,9361	1,8674	1,9738

cuadrados

3,223	2,866	3,253	2,799
3,279	2,844	2,527	2,692
3,018	2,896	3,145	2,597
3,894	3,457	4,216	3,169
4,074	3,862	3,451	4,974
3,456	3,749	3,487	3,896

AxBxC

	14		24	
	3,5	3	3,5	3
1	5,34315499	5,081024325	5,16683733	4,92516348
2	5,850766707	5,760529401	5,77845772	5,98426484

cuadrados

28,54930525	25,81680819	26,696208	24,2572353
34,23147106	33,18369898	33,3905737	35,8114257

AxB

	14	24	B
3,5	11,1939217	10,9452951	22,1392167
3	10,84155373	10,9094283	21,7509821
A	22,03547542	21,8547234	

cuadrados

125,303883	119,799484
117,5392872	119,015626

AxC

	14	24	C
1	10,4241793	10,0920008	20,51618013
2	11,6112961	11,7627226	23,37401867

cuadrados

108,663514	101,84848
134,822197	138,361642

BxC

	3,5	3
1	10,5099923	10,0061878
2	11,6292244	11,7447942

cuadrados

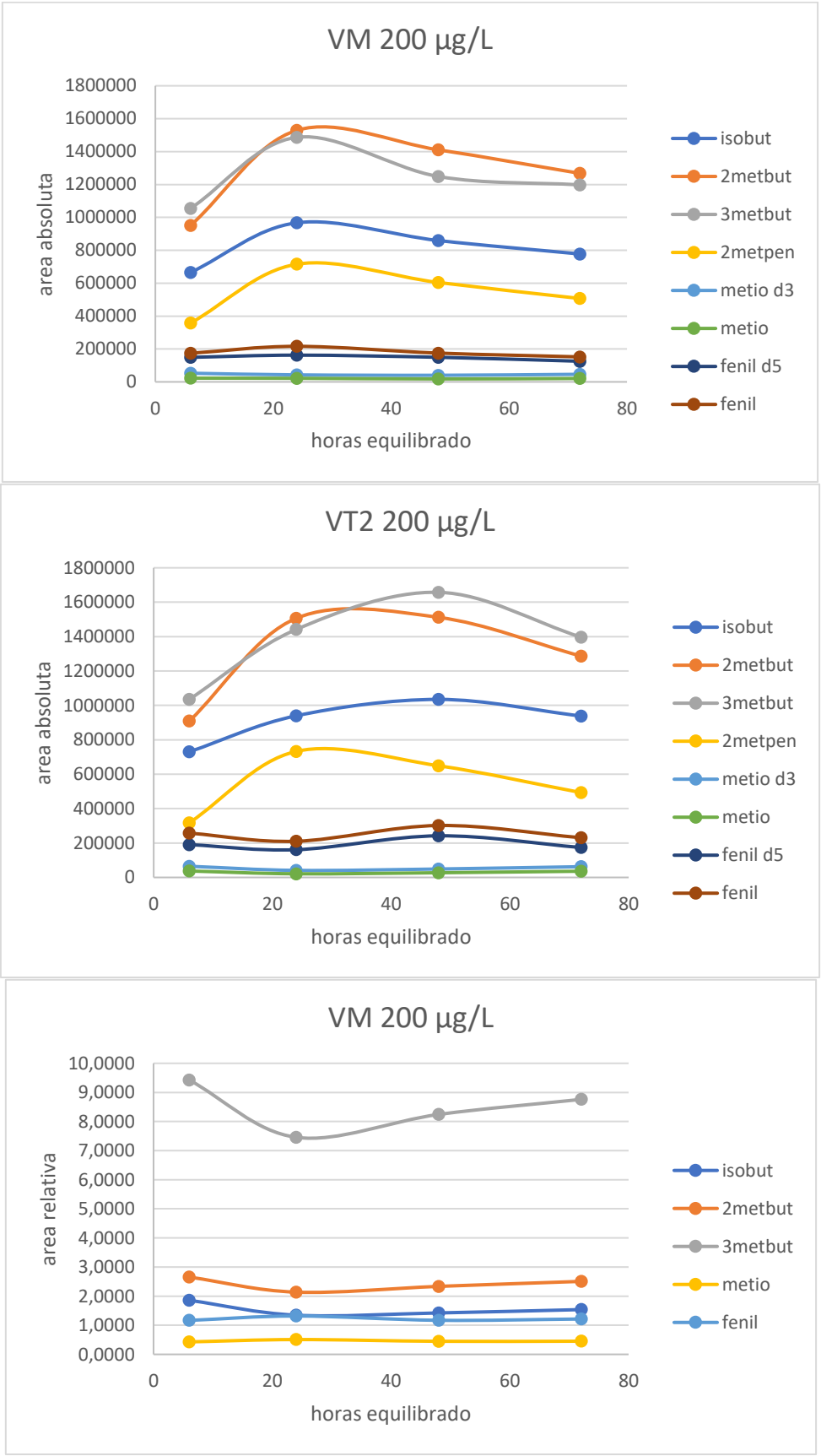
110,459939	100,123794
135,238861	137,940192

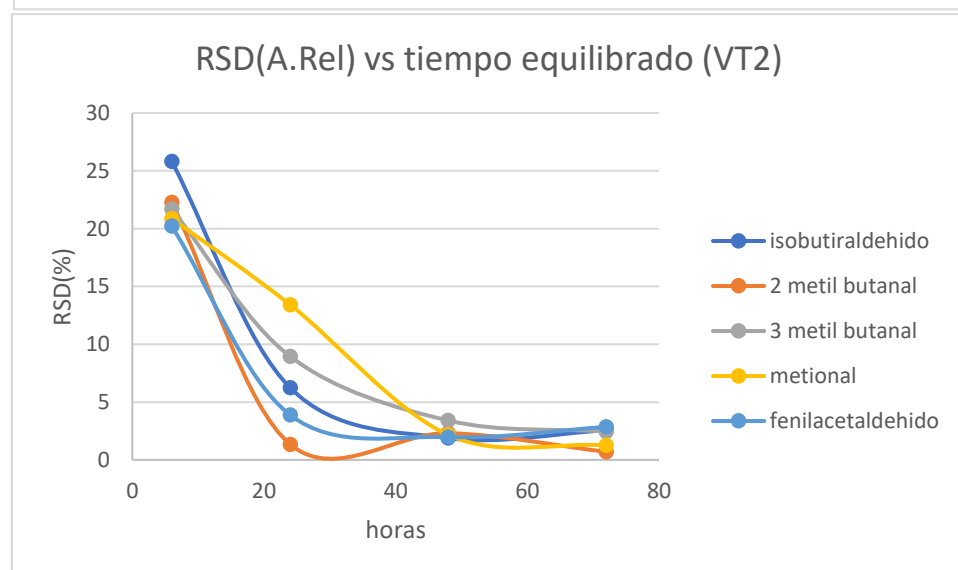
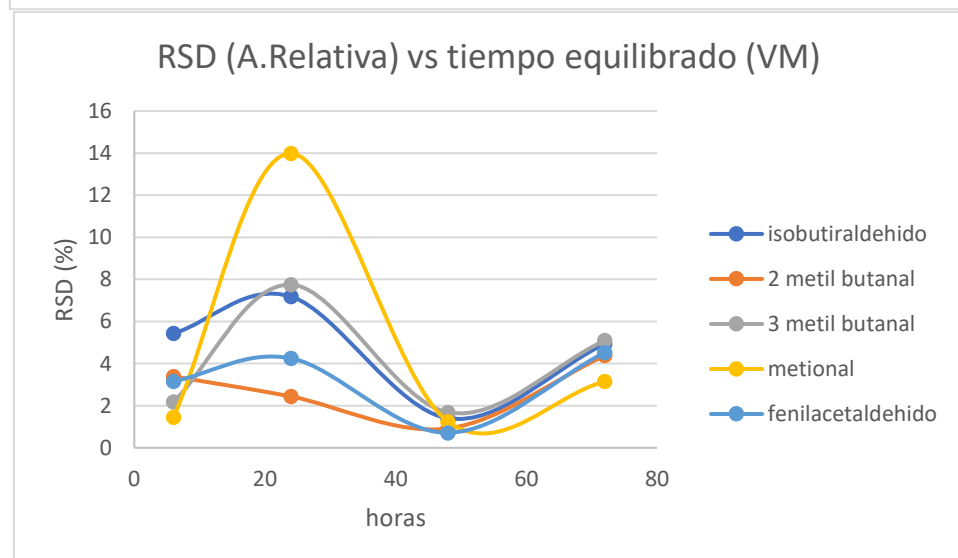
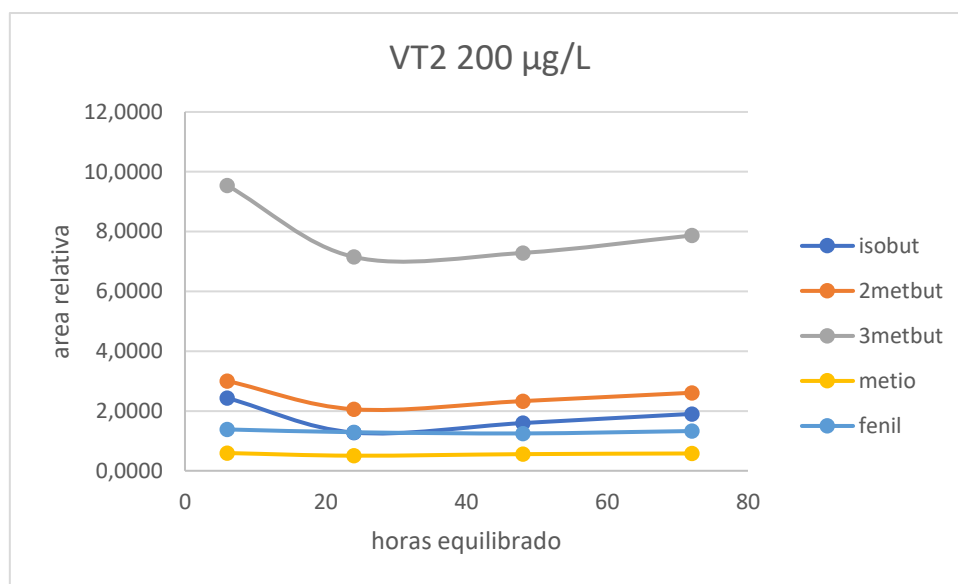
	suma de cuadrados	gdl	CM	F_Exp	95% F_teo	99% F_teo
total	0,5587	23				
A (tiempo)	0,0014	1	0,0014	0,1226	4,494	8,531
B (pH)	0,0063	1	0,0063	0,5656		
C (der)	0,3403	1	0,3403	30,6477		
AB	0,0042	1	0,0042	0,3759		
AC	0,0097	1	0,0097	0,8776		
BC	0,0160	1	0,0160	1,4396		
ABC	0,0032	1	0,0032	0,2850		
residual	0,1777	16	0,0111			

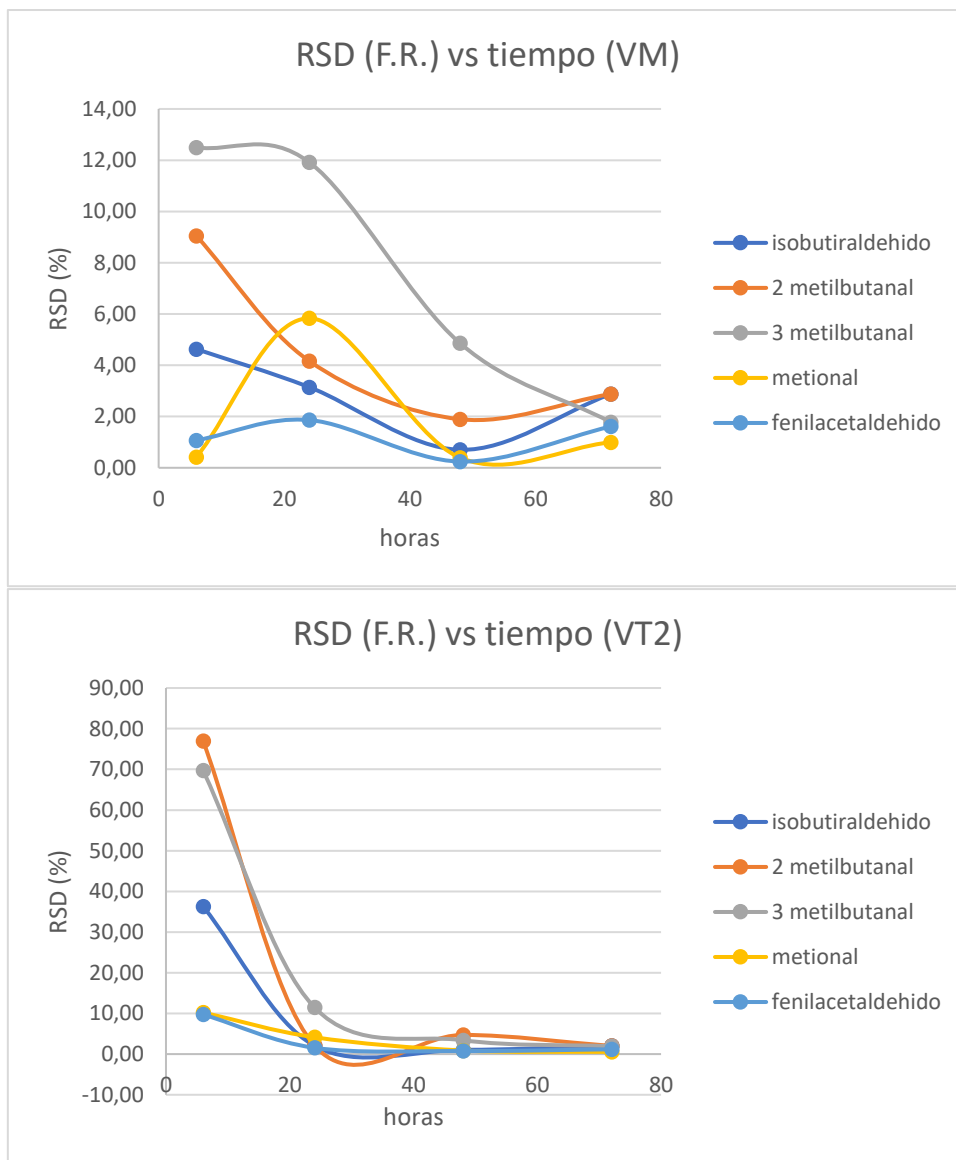
F_95%	4,494	F_99%	8,531
-------	-------	-------	-------

F_exp	Isobutiraldehído	2-metilbutanal	3-metilbutanal	Metional	Fenilacetaldehído
A (tiempo)	0,123	1,099	2654,231	5,239	4,323
B (pH)	0,566	0,362	155,710	28,174	85,261
C (der)	30,648	52,179	2565,440	7,595	106,051
AB	0,376	0,064	0,006	0,075	1,306
AC	0,878	0,013	196,745	0,185	9,850
BC	1,440	1,328	90,619	0,810	28,959
ABC	0,285	0,787	0,467	1,277	4,100

Anexo 5. Gráficas y tablas del ensayo 5.







Factor de respuesta (L/ μ g)	VM (48 h)			VT2 (48 h)			p
	Rep 1	Rep 2	Rep 3	Rep 1	Rep 2	Rep 3	
Isobutiraldehído	6,679	6,657	6,848	6,556	6,842	6,809	
2-metilbutanal	13,799	13,924	14,070	13,447	13,914	14,111	
3-metilbutanal	32,863	33,426	34,311	32,790	33,791	35,376	
Metional	5,108	4,995	4,957	5,050	5,285	5,377	
Fenilacetaldehído	5,171	5,187	5,258	5,335	5,489	5,609	
	media	s	RSD	media	s	RSD	
Isobutiraldehído	6,73	0,1042	1,55	6,74	0,1566	2,32	0,9508
2-metilbutanal	13,93	0,1359	0,98	13,82	0,3411	2,47	0,6632
3-metilbutanal	33,53	0,7297	2,18	33,99	1,3039	3,84	0,6523
Metional	5,02	0,0783	1,56	5,24	0,1690	3,23	0,1805
Fenilacetaldehído	5,21	0,0465	0,89	5,48	0,1374	2,51	0,0832

Factor de respuesta (L/ μ g)	VM (72 h)			VT2 (72 h)			p
	Rep 1	Rep 2	Rep 3	Rep 1	Rep 2	Rep 3	
Isobutiraldehído	7,609	6,832	7,352	7,670	8,172	7,863	
2-metilbutanal	15,352	14,099	15,252	15,194	15,420	15,345	
3-metilbutanal	36,210	33,496	38,170	35,157	37,038	35,455	
Metional	4,971	4,769	5,170	5,401	5,309	5,196	
Fenilacetaldehído	5,208	4,985	5,590	5,812	5,392	5,569	
	media	s	RSD	media	s	RSD	
Isobutiraldehído	7,26	0,3962	5,45	7,90	0,2534	3,21	0,1435
2-metilbutanal	14,90	0,6963	4,67	15,32	0,1150	0,75	0,4122
3-metilbutanal	35,96	2,3472	6,53	35,88	1,0113	2,82	0,9639
Metional	4,97	0,2004	4,03	5,30	0,1025	1,93	0,1251
Fenilacetaldehído	5,26	0,3061	5,82	5,59	0,2108	3,77	0,2640

Anexo 6. Eficiencia cromatográfica. Número de platos teóricos en el ensayo 6.

Para evaluar la eficiencia cromatográfica, si bien el software utilizado no presenta la anchura de pico como resultado, si permite aportándole algunos parámetros, el cálculo del número de platos teóricos. En la versión del software utilizado para este trabajo (GCMS solution v4.45 Shimadzu Corporation) están programadas varios algoritmos de cálculo, que se diferencian en el punto en el que se mide la anchura, a mitad de la altura del pico, o en la base.

Para que el software provea de estos parámetros es necesario haber integrado en cromatograma, tras lo cual en “GCMS postrun analysis/quantitative/QA-QC/unknown/column performance/Theoretical plates numbres”. Dando lugar a una tabla como la siguiente:

<Report for Sample Type "Unknown">

- Index
 - Column Performance
- <Output Date> 09/09/2019 16:18:28
- <Method File Name>

Column Performance

- Count 1

Data	Data File Path	Sample Name	Sample ID	Analysis Date	Data File Status
Data1:	G:\Mi unidad LAAE ensayo tiempo equilibrado 50C\cromatogramas\AldOxOscar HORNO 6H A_24072019_31.qgd	AldOxOscar HORNO 6H A		24/07/2019 23:32:21	Normal

- Result

ID	Compound Name	T Plate
1	Isobutiraldehído	670231.502473
2	2metilbutanal	806652.218714
3	3metilbutanal1	1299981.162272
4	3metilbutanal2	1392385.631696
5	2metilpentanal1	1089449.166482
6	2metilpentanal2	-
7	3metilpentanal1	1532660.353091
8	3metilpentanal2	1672604.203678
9	metionaldeuterado	1312813.746044
10	metional	1369347.957433
11	4metiltiobutanol	-
12	fenilacetaldéhidido deuterado	1095408.949836
13	fenilacetaldéhidido	1140209.589886
14	4metilfenilacetaldéhidido	-

Para poder elegir el criterio de cálculo que nos interesa debemos modificar en “GCMS postrun analysis/qualitative/qualitative parameters/column performance” y en método de cálculo señalar “Area/height”, para tomar la anchura en la base del pico.

$$N = 16 * \left(\frac{t_r}{W} \right)^2$$

Se adjuntan las eficiencias calculadas para las muestras de 6 horas a 50°C del ensayo 6 sobre vino tinto 3, así como su media, desviación estándar y RSD.

Platos teóricos						
	Rep 1	Rep 2	Rep 3	Media s		RSD
Isobutiraldehido	670.232	650.172	720.319	680.241	36129	5,31
2-metilbutanal	806.652	843.279	813.769	821.233	19421	2,36
3-metilbutanal 1	1.299.981	1.221.460	1.344.305	1.288.582	62211	4,83
3-metilbutanal 2	1.392.386	1.348.354	1.399.568	1.380.102	27729	2,01
2-metilpentanal	1.089.449	1.063.802	1.074.962	1.076.071	12860	1,20
3-metilpentanal 1	1.532.660	1.595.219	1.604.642	1.577.507	39123	2,48
3-metilpentanal 2	1.672.604	1.604.927	1.617.494	1.631.675	35998	2,21
Metional d3	1.312.814	1.340.246	1.357.061	1.336.707	22335	1,67
Metional	1.369.348	1.381.654	1.463.192	1.404.731	51001	3,63
Fenilacetaldehido d5	1.095.409	1.097.680	1.144.808	1.112.632	27888	2,51
Fenilacetaldehido	1.140.210	1.137.359	1.187.801	1.155.123	28336	2,45